

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公表

⑫ 公表特許公報(A)

平5-506364

⑬ Int. Cl.

C 12 N 9/12  
1/21

識別記号

庁内整理番号

7823-4B  
7236-4B  
8931-4B

審査請求有  
予備審査請求有

C 12 N 15/00

⑭ 公表 平成5年(1993)9月22日

部門(区分) 1(1)

A※

(全47頁)

⑮ 発明の名称 熱安定性 DNAポリメラーゼの5'→3'のエキソヌクレアーゼ突然変異

⑯ 特 願 平3-516787

⑰ 出 願 平3(1991)9月30日

⑱ 翻訳文提出日 平5(1993)3月29日

⑲ 国際出願 PCT/US91/07035

⑳ 国際公開番号 WO92/06200

㉑ 国際公開日 平4(1992)4月16日

優先権主張 ㉒ 1990年9月28日 ㉓ 米国(US) ㉔ 590,213

⑳ 発 明 者 ゲルフアンド, デビッド エイ アメリカ合衆国, カリフォルニア 94611, オークランド, チェルトン ドライブ 6208

㉑ 出 願 人 エフ. ホフマンローラ ロシュ スイス国, ツューバーン 4002 パーゼル, グレンツアツハーシュトアクチエンゲゼルシャフト ラーセ 124

㉒ 代 理 人 弁理士 宇井 正一 外4名

㉓ 指 定 国 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), CA, CH(広域特許), DE(広域特許), DK(広域特許), ES(広域特許), FR(広域特許), GB(広域特許), GR(広域特許), IT(広域特許), JP, LU(広域特許), NL(広域特許), SE(広域特許), US

最終頁に続く

#### 請求の範囲

1. 天然ポリメラーゼの5'→3' エキソヌクレアーゼ活性から変化した当該活性を有する組換え型熱安定性DNAポリメラーゼ酵素。
2. 天然ポリメラーゼの5'→3' エキソヌクレアーゼ活性に比べて高い当該活性が示される、請求項1に記載の組換え型熱安定性DNAポリメラーゼ酵素。
3. アミノ酸配列A(X)YG(ここでXはV又はTである)(配列番号:15)、及び/又はアミノ酸配列X<sub>1</sub>YX<sub>2</sub>(ここでX<sub>1</sub>はI、L又はAであり、そしてX<sub>2</sub>は3個のアミノ酸から成る任意の配列である)(配列番号:20)を含んで成る、請求項2に記載の組換え型熱安定性DNAポリメラーゼ酵素。
4. 天然DNAポリメラーゼの5'→3' エキソヌクレアーゼ活性より低い当該活性が示される、請求項1に記載の組換え型熱安定性DNAポリメラーゼ酵素。
5. 天然形態においてはアミノ酸配列A(X)YG(ここで、XはV又はTである)(配列番号:15)を含んで成り、このアミノ酸配列が組換え型酵素中では変異又は欠失されている、請求項4に記載の組換え型熱安定性DNAポリメラーゼ酵素。
6. 配列番号:15のGが変異させられている、請求項5に記載の組換え型熱安定性DNAポリメラーゼ酵素。
7. 配列番号:15のGがAに変異させられている、請求項6に記載の組換え型熱安定性DNAポリメラーゼ酵素。
8. 天然形態ではアミノ酸配列HAYG(配列番号:16)を含んで成り、このアミノ酸配列が組換え型酵素中では変異又は欠失されている、請求項4に記載の組換え型熱安定性DNAポリメラーゼ酵素。
9. 天然形態ではアミノ酸配列HAYR(配列番号:17)を含んで成

り、このアミノ酸配列が組換え型酵素中では変異又は欠失されている、請求項4に記載の組換え型熱安定性DNAポリメラーゼ酵素。

10. 天然形態ではアミノ酸配列XLEI(ここで、XはL又はIである)(配列番号:18)を含んで成り、このアミノ酸配列が組換え型酵素中では変異又は欠失されている、請求項4に記載の組換え型熱安定性DNAポリメラーゼ酵素。

11. テルムス(*Thermus*) スペースspall、テルムス(*Thermus*) スペースZ05、テルムス・アクアチクス(*Thermus aquaticus*)、テルムス・サーモフィルス(*Thermus thermophilus*)、テルモシボアフリカヌス(*Thermosiphon africanus*)及びテルモトガ・マリチマ(*Thermotoga maritima*)の変異体形態から成る群から選択された、請求項4に記載の組換え型熱安定性DNAポリメラーゼ酵素。

12. 配列番号:2のアミノ酸77-832を含んで成るテルムス・アクアチクス(*Thermus aquaticus*)の変異体形態である、請求項11に記載の組換え型熱安定性DNAポリメラーゼ酵素。

13. 配列番号:2のアミノ酸47-832を含んで成るテルムス・アクアチクス(*Thermus aquaticus*)の変異体形態である、請求項11に記載の組換え型熱安定性DNAポリメラーゼ酵素。

14. 配列番号:2のアミノ酸155-832を含んで成るテルムス・アクアチクス(*Thermus aquaticus*)の変異体形態である、請求項11に記載の組換え型熱安定性DNAポリメラーゼ酵素。

15. 配列番号:2のアミノ酸208-832を含んで成るテルムス・アクアチクス(*Thermus aquaticus*)の変異体形態である、請求項11に記載の組換え型熱安定性DNAポリメラーゼ酵素。

16. 配列番号:2のアミノ酸290-832を含んで成るテルムス・アクアチクス(*Thermus aquaticus*)の変異体形態である、請求項11に記載の組換え型熱安定性DNAポリメラーゼ酵素。

17. 配列番号: 4 アミノ酸38-893 を含んで成るテルモトガ・マリチマ (*Thermotoga maritima*) の変異体形題である、請求項11に記載の組換え型熱安定性DNA ポリメラーゼ酵素。

18. 配列 号: 4 のアミノ酸21-893 を合んで成るテルモトガ・マリチマ (*Thermotoga maritima*) の変異体形腫である、請求項11 に記載の置換え型熱安定性DNA ポリメラーゼ酵素。

19. 配列番号: 4 のアミノ酸 74~893 を含んで成るチルモトガマリチマ (*Theropota maritima*) の変異形態である、請求項11に記載の組織型熱安定性DNA ポリメラーゼ酵素。

20. 配列番号: 4 のアミノ酸 140~893 を含んで成るテルモトガマリチマ (*Thermotoga maritima*) の変異形態である、請求項IIに記載の組織と樹幹安定性DNA ポリメラーゼ酵素。

21. 配列番号: 4 のアミノ酸 284~893 を含んで成るテルモトガ・マリテマ (*Thermotoga maritima*) の変異形態である、請求項IIに記載の組換え型熱安定性DNA ポリメラーゼ酵素。

22. 配列番号: 6 のアミノ酸44~830 を含んで成るテルムス (*Thermus*) スペースス *sp*17 の変異体形態である、請求項11に記載の組換え熱安定性DNA ポリメラーゼ酵素。

23. 配列番号: 6 のアミノ酸 74~830 を含んで成るテルムス (*Thermus*) スペースス *sp* 17 の変異体形態である、請求項 11 に記載の組換え型熱安定性 DNA ポリメラーゼ酵素。

24. 配列番号: 6 のアミノ酸 152~830 を含んで成るテルムス (*Thermus*) スペースス *sp*17 の変異体形態である、請求項11に記載の組換え型熱安定性DNA ポリメラーゼ酵素。

25. 配列番号: 6 のアミノ酸 200~830 を含んで成るテルムス (*Thermus*) スペース *spa17* の変異体形態である、請求項11に記載の組換え型熱安定性DNA ポリメラーゼ酵素。

35. 配列番号: [Oのアミノ酸 204~834 を含んで成るテルムス・サーモフィルス (*Thermus thermophilus*) の変異体形態である、増殖項IIに記載の組換え耐熱安定性DNA ポリメラーゼ酵素。

36. 配列番号: 10のアミノ酸 292~834 を含んで成るテルムス・サーモフィルス (*Thermus thermophilus*) の変異体形態である、該変異体に記載の組織型熱安定性DNA ポリメラーゼ酵素。

37. 配列番号: 12の7ミノ酸38~892を含んで成るテルモシボ・  
アフリカヌス (*Thermosipho africanus*) の変異体形態である、特  
許項11に記載の組換え型熱安定性DNAポリメラーゼ酵素。

38. 配列番号: 12の7ミノ酸94~892を含んで成るテルモシボ・アフリカヌス (*Thermosiphon africanus*) の変異体形態である、請求項11に記載の組換え型熱安定性DNAポリメラーゼ酵素。

39. 配列番号: 12のアミノ酸 140~892 を含んで成るテルモシホ  
 アフカヌス (*Thermophilus africanus*) の変異形態である、精求  
 現11に記載の組織型熱安定性DNAポリメラーゼ酵素。

40. 配列番号: 12のアミノ酸 204~892 を含んで成るテルモシホ・  
アフリカヌス (*Thermosiphon africanus*) の変異形態である、請求  
項11に記載の組織より熱安定性DNA ポリメラーゼ酵素。

41. 配列番号: 12 のアミノ酸 285~892 を含んで成るテルモシホ・  
アフリカス (*Thermosipho africanus*) の変異形態である、球形  
膜に包まれた超熱安定性 DNA ポリメラーゼ酵素。

42. 請求の範囲第11項に記載の熱安定性DNAポリメラーゼ酵素をコードするDNA配列において、この酵素が*Thermus*・*Aquaticus* (*Thermus aquaticus*)の変異体形態であり、そして配列番号: 1のヌクレオチド229-2499を含んで成るDNA配列。

43. 請求項11に記載の熱安定性DNAポリメラーゼ酵素をコードするDNA配列において、この酵素がテルムス・アクアチクス (*Thermus*

26. 配列番号: 6 アミノ酸 288~830 を含んで成るテルムス (*Thermus*) スペース sps17 の変異体形態である、請求項1に記載の組換え型熱安定性DNA ポリメラーゼ酵素。

27. 配列番号: 8 のアミノ酸 47~834 を含んで成るテルムス (*Thermus*) スペース 205 の変異体形態である、請求項 11 に記載の組換え型熱安定性 DNA ポリメラーゼ酵素。

28. 配列番号: 8のアミノ酸78~834を含んで成るテルムス (Thermus) スペース205の変異体形態である、請求項目1に記載の組換え型熱安定性DNAポリメラーゼ酵素。

29. 配列番号: 8 のアミノ酸 156-834 を含んで成るテルムス (*Thermus*) スペース 205 の変異体形態である、請求項IIに記載の組織型熱安定性DNAポリメラーゼ酵素。

30. 配列番号: 8 のアミノ酸 204~834 を含んで成るテルムス (*Thermus*) スペース 205 の変異体形態である、請求項 11 に記載の組換え型熱安定性 DNA ポリメラーゼ酵素。

31. 配列番号 18 のアミノ酸 292~834 を含んで成るテルムス (*Thermus*) スペーシス 205 の変異体形態である、請求項 11 に記載の組換え型熱安定性 DNA ポリメラーゼ酵素。

32. 配列番号: 10のアミノ酸47~834を合んで成るテルムス・サーモフィルス (*Thermus thermophilus*) の変異形態である、請求項11に記載の組換え型熱安定性DNAポリメラーゼ酵素。

33. 配列番号: 10のアミノ酸78~834を含んで成るテルムス・サーモフィルス (*Thermus thermophilus*) の変異体形態である、請求項11に記載の超熱え型熱安定性DNAポリメラーゼ酵素。

34. 配列番号: 10のアミノ酸 156~834 を含んで成るチルムス・サーモフィルス (*Thermus thermophilus*) の変異体形態である、請求項11に記載の組換え型熱安定性DNA ポリメラーゼ酵素。

aquaticus) の変異体形態であり、そして配列番号: 1 のヌクレオチド 139-2499 を含んで成る DNA 配列。

44. 請求項11に記載の熱安定性DNAポリメラーゼ酵素をコードするDNA配列において、この酵素がテルムス・アクアチクス (*Thermus aquaticus*) の変異体形態であり、そして配列番号: 1 のヌクレオチド463-2499を含んで成るDNA配列。

45. 請求項11に記載の熱安定性DNAポリメラーゼ酵素をコードするDNA配列において、この酵素が*Thermus*・*Aquaticus* (*Thermaquaticus*)の実属体形態であり、そして配列番号: 1のヌクレオチド607-2499を含んで成るDNA配列。

46. 請求項11に記載の熱安定性DNAポリメラーゼ酵素をコードするDNA配列において、この酵素が*Thermus aquaticus* (Taq) の変異体形態であり、そして配列番号: 1 のヌクレオチド868-2499を含んでいるDNA配列。

47. 請求項IIに記載の熱安定性DNAポリメラーゼ酵素をコードするDNA配列において、この酵素がテルモトガ・マリチマ (*Thermotoga maritima*) の変異体形態であり、そして配列番号: 3 のヌクレオチド132-2682を含んで成るDNA配列。

48. 請求項11に記載の熱安定性DNAポリメラーゼ酵素をコードするDNA配列において、この酵素がテルモトガ・マサチマ (*Thermotoga maritima*) の変異体形態であり、そして配列番号: 3 のヌクレオチド 61-2682 を含んで成るDNA配列。

49. 請求項11に記載の熱安定性DNAポリヌラーゼ酵素をコードするDNA配列において、この酵素がテルモトガ・マリチマ (*Thermotoga maritima*) の複製体形態であり、そして配列番号: 3 のヌクレオチド220-2682を含んで成るDNA配列。

50. 請求項11に記載の熱安定性DNAポリメラーゼ酵素をコードす

るDNA配列において、この酵素がテルモトガ・マリチマ (*Thermotoga maritima*) の変異体形態であり、そして配列番号: 3 のヌクレオチド418-2682を含んで成るDNA配列。

51. 請求項IIに記載の熱安定性DNAポリメラーゼ酵素をコードするDNA配列において、この酵素がテルモトガ・マリチマ (*Thermotoga maritima*) の変異体形態であり、そして配列番号: 3 のヌクレオチド850-2682を含んで成るDNA配列。

52. 請求項IIに記載の熱安定性DNAポリメラーゼ酵素をコードするDNA配列において、この酵素がテルモトガ・マリチマ (*Thermotoga maritima*) の変異体形態であり、そして配列番号: 5 のヌクレオチド130-2493を含んで成るDNA配列。

53. 請求項IIに記載の熱安定性DNAポリメラーゼ酵素をコードするDNA配列において、この酵素がテルムス (*Thermus*) スペース sp.17の変異体形態であり、そして配列番号: 5 のヌクレオチド220-2493を含んで成るDNA配列。

54. 請求項IIに記載の熱安定性DNAポリメラーゼ酵素をコードするDNA配列において、この酵素がテルムス (*Thermus*) スペース sp.17の変異体形態であり、そして配列番号: 5 のヌクレオチド454-2493を含んで成るDNA配列。

55. 請求項IIに記載の熱安定性DNAポリメラーゼ酵素をコードするDNA配列において、この酵素がテルムス (*Thermus*) スペース sp.17の変異体形態であり、そして配列番号: 5 のヌクレオチド598-2493を含んで成るDNA配列。

56. 請求項IIに記載の熱安定性DNAポリメラーゼ酵素をコードするDNA配列において、この酵素がテルムス (*Thermus*) スペース sp.17の変異体形態であり、そして配列番号: 5 のヌクレオチド862-2493を含んで成るDNA配列。

オチド232-2505を含んで成るDNA配列。

64. 請求項IIに記載の熱安定性DNAポリメラーゼ酵素をコードするDNA配列において、この酵素がテルムス・サーモフィルス (*Thermus thermophilus*) の変異体形態であり、そして配列番号: 9 のヌクレオチド466-2505を含んで成るDNA配列。

65. 請求項IIに記載の熱安定性DNAポリメラーゼ酵素をコードするDNA配列において、この酵素がテルムス・サーモフィルス (*Thermus thermophilus*) の変異体形態であり、そして配列番号: 9 のヌクレオチド610-2505を含んで成るDNA配列。

66. 請求項IIに記載の熱安定性DNAポリメラーゼ酵素をコードするDNA配列において、この酵素がテルムス・サーモフィルス (*Thermus thermophilus*) の変異体形態であり、そして配列番号: 9 のヌクレオチド874-2505を含んで成るDNA配列。

67. 請求項IIに記載の熱安定性DNAポリメラーゼ酵素をコードするDNA配列において、この酵素がテルモシボ・アフリカヌス (*Thermosipho africanus*) の変異体形態であり、そして配列番号: 11のヌクレオチド112-2679を含んで成るDNA配列。

68. 請求項IIに記載の熱安定性DNAポリメラーゼ酵素をコードするDNA配列において、この酵素がテルモシボ・アフリカヌス (*Thermosipho africanus*) の変異体形態であり、そして配列番号: 11のヌクレオチド280-2679を含んで成るDNA配列。

69. 請求項IIに記載の熱安定性DNAポリメラーゼ酵素をコードするDNA配列において、この酵素がテルモシボ・アフリカヌス (*Thermosipho africanus*) の変異体形態であり、そして配列番号: 11のヌクレオチド418-2679を含んで成るDNA配列。

70. 請求項IIに記載の熱安定性DNAポリメラーゼ酵素をコードするDNA配列において、この酵素がテルモシボ・アフリカヌス

57. 請求項IIに記載の熱安定性DNAポリメラーゼ酵素をコードするDNA配列において、この酵素がテルムス (*Thermus*) スペース 205 の変異体形態であり、そして配列番号: 7 のヌクレオチド139-2505を含んで成るDNA配列。

58. 請求項IIに記載の熱安定性DNAポリメラーゼ酵素をコードするDNA配列において、この酵素がテルムス (*Thermus*) スペース 205 の変異体形態であり、そして配列番号: 7 のヌクレオチド232-2505を含んで成るDNA配列。

59. 請求項IIに記載の熱安定性DNAポリメラーゼ酵素をコードするDNA配列において、この酵素がテルムス (*Thermus*) スペース 205 の変異体形態であり、そして配列番号: 7 のヌクレオチド476-2505を含んで成るDNA配列。

60. 請求項IIに記載の熱安定性DNAポリメラーゼ酵素をコードするDNA配列において、この酵素がテルムス (*Thermus*) スペース 205 の変異体形態であり、そして配列番号: 7 のヌクレオチド610-2505を含んで成るDNA配列。

61. 請求項IIに記載の熱安定性DNAポリメラーゼ酵素をコードするDNA配列において、この酵素がテルムス (*Thermus*) スペース 205 の変異体形態であり、そして配列番号: 7 のヌクレオチド874-2505を含んで成るDNA配列。

62. 請求項IIに記載の熱安定性DNAポリメラーゼ酵素をコードするDNA配列において、この酵素がテルムス・サーモフィルス (*Thermus thermophilus*) の変異体形態であり、そして配列番号: 9 のヌクレオチド139-2505を含んで成るDNA配列。

63. 請求項IIに記載の熱安定性DNAポリメラーゼ酵素をコードするDNA配列において、この酵素がテルムス・サーモフィルス (*Thermus thermophilus*) の変異体形態であり、そして配列番号: 9 のヌクレ

(*Thermosipho africanus*) の変異体形態であり、そして配列番号: 11のヌクレオチド610-2679を含んで成るDNA配列。

71. 請求項IIに記載の熱安定性DNAポリメラーゼ酵素をコードするDNA配列において、この酵素がテルモシボ・アフリカヌス (*Thermosipho africanus*) の変異体形態であり、そして配列番号: 11のヌクレオチド853-2679を含んで成るDNA配列。

72. 請求項3に記載の熱安定性DNAポリメラーゼ酵素をコードするDNA配列。

73. 請求項5~10のいずれか1項に記載の熱安定性DNAポリメラーゼ酵素をコードするDNA配列。

74. 請求項42~73のいずれか1項に記載のDNA配列を含んで成る組換え型DNAベクター。

75. 請求項74に記載のベクターで形質転換された組換え型宿主細胞。

熱安定性DNAポリメラーゼの5'→3'のエキソヌクレアーゼ突然変異

関連出願に対するクロスリファレンス

本出願は、全て1990年9月28日付で提出され、全て、米国特許第4,889,818号として発行され1986年8月22日付の放棄された899,241号の一部継続出願(CIP)である1987年6月17日付第063,509号のCIPである1988年1月12日付の放棄された第143,441号のCIPである1990年5月15日付の第523,394号のCIPである同時係属出願第590,213号、590,466号及び590,490号の一部継続出願(CIP)である。

本出願は同様に、1)1988年1月12日付第143,441号及び上述のとおりその祖型のCIPである1989年12月22日付第455,611号のCIPである1990年9月20日付の第585,471号のCIPである1990年12月21日付PCT/US90/07641;及び2)1990年7月24日付第557,517号のCIPである1990年11月2日付第609,157号のCIPである1991年8月15日付の第746,121号のCIPでもある。

このCIPは同様に、以下の特許出願にも関連する:

1990年5月15日付米国特許第523,394号;

1989年12月22日付米国特許第455,967号;

1991年8月6日付PCT出願第91/05571号;

1991年8月13日付PCT出願第91/05753号。

この項で参照指示されている特許出願明細書は全て、本書に参考として内合される。

スクレオシド三磷酸、適当な緩衝液及び反応条件、並びにポリメラーゼが用いられる。各々のプライムの延長生成物は望ましい塩酸配列の生産のための模型となる。2つの特許は、使用するポリメラーゼが熱安定性酵素である場合、熱がポリメラーゼ活性を破壊することはないことから全ての変性段階の後にポリメラーゼを付加する必要が無いということを開示している。

米国特許第4,889,818号、欧州特許公報第258,017号及びPCT公報第89/06691は、*Thermus*・*Aquaticus* (*Thermus aquaticus*) からの~94kDaの熱安定性DNAポリメラーゼの単離及び組換え体発現ならびにPCRにおけるこのポリメラーゼの利用について記述している(これらの記載を引用により本明細書に組み入れる)。T. *Aquaticus* (*T. aquaticus*) DNAポリメラーゼは、PCR及びその他の組換えDNA技法において使用するのに特に好まれるものであるが、その他の熱安定性ポリメラーゼに対する必要性も残っている。

#### 発明の要約

その他の熱安定性ポリメラーゼに対する必要性に取り組みながら、当該発明者は、*Thermus*・*Aquaticus* (*Thermus aquaticus*) (Tag) から分離されたもののようないくつかの熱安定性DNAポリメラーゼが5'→3'エキソヌクレアーゼ又は構造依存性一本鎖エンドヌクレアーゼ(SSSE)活性を示すことを見出した。以下でさらに詳細に説明するように、このような5'→3'のエキソヌクレアーゼ活性は、生産される生成物の量を制限し、通常は指数的に蓄積される生成物のプラトー現象に貢献する可能性があることから、PCRで使用する酵素の中では望ましくないものである。さらに、熱安定性DNAポリメラーゼ内の5'→3'ヌクレアーゼ活性の存在は、にG+Cが豊富な領域について10kb以上の長いPCR生成物を効率的に生成

#### 発明の分野

本発明は、未変性酵素が示すものとは異なるレベルの5'→3'エキソヌクレアーゼ活性が示されるように変更又は突然変異された熱安定性DNAポリメラーゼに関する。本発明は同様に、このような変更ポリメラーゼを単離及び生産するための手段にも関する。熱安定性DNAポリメラーゼは数多くの組換えDNA技術、特にポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による核酸増幅、自立的(self-sustained)配列複製(3SR)及び高温DNA配列決定において役立つものである。

#### 背景技術

大腸菌(*E. coli*)などの中温菌からのDNAポリメラーゼの単離に関しては広範な研究が行われてきた。例えばBessan他、1957年、*J. Biol. Chem.* 221: 171-177及びButtin及びFornberg、1966年、*J. Biol. Chem.* 241: 5419-5427を参照のこと。

幾分か少ないものの、*Thermus*・*Aquaticus* (*Thermus aquaticus*)、*Thermus*・*Saurophilus* (*Thermus thermophilus*)、*Thermotoga*・*Martima* (*Thermotoga maritima*)、*Thermus* (*Thermus*) スペース17、*Thermus* (*Thermus*) スペース205及び*Thermophilus*・*Africans* (*Thermophilus africanus*) といった好熱生物からDNAポリメラーゼを単離及び純化することについても研究が行われてきた。当初存在している量に比べて多い量に既存の核酸配列を増幅するために熱安定性酵素を使用することは、米国特許第4,683,195号及び4,683,202号の中で記述されていた(引用により、これらを本明細書に組み入れる)。標的DNAの変性、プライムのハイブリッド形成及び相補鎖の合成が関与するPCR方法では、プライム、誘型、

する能力の欠陥に貢献する可能性がある。DNA配列決定の利用分野及びサイクル配列決定の利用分野においては、5'→3'のヌクレアーゼ活性の存在は、望まれるバンド強度の減少及び/又は類似又はバックグラウンドバンドの生成に貢献する可能性がある。最後に、5'→3'ヌクレアーゼ活性が無ければ、組換え型ポリメラーゼーリガーゼ連鎖反応(PLCR)検定におけるより高濃度の対立遺伝子識別を容易にすることができる。

しかしながら、熱安定性DNAポリメラーゼにおける強化された又はより多くの量の5'→3'エキソヌクレアーゼ活性は、標的核酸配列の同時の増幅及び検出のための均質検定システムにおいて用いられるような酵素においては望ましいものであり得る。一般に、強化された5'→3'のエキソヌクレアーゼ活性は、高められたエキソヌクレアーゼ開裂速度又はニクトランスレーション合成の高められた速度、或いは又フラグメントの開裂の前の比較的大きなヌクレオチドフラグメントの置換によって定義づけされる。

従って、本発明は、変更された5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を示す熱安定性DNAポリメラーゼを提供することによって先行技術の必要性を満たすべく開発された。熱安定性DNAポリメラーゼの使用目的に応じて、ポリメラーゼの5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を、一定範囲の5'→3'エキソヌクレアーゼ活性が発現されるように変更することが可能である。この5'→3'エキソヌクレアーゼ活性の範囲は、強化された活性から活性の全く欠如した状態にまで広がっている。いくつかのPCR利用分野例えば均質検定においては強化された活性が有利であるが、その他のほとんどのPCR利用分野において利用される熱安定性DNAポリメラーゼにおいては、できるかぎり少ない5'→3'エキソヌクレアーゼ活性が望まれる。

同様に部位特異的突然変異誘発ならびに欠失突然変異誘発が両方

共、本発明の熱安定性DNAポリメラーゼにおける望ましい変更された5'→3'エキソヌクレアーゼ活性をもたらしうということも見出された。エキソヌクレアーゼ活性を変えるいくつかの突然変異がDNAポリメラーゼのプロセッシングの可能性を変えることがわかっている。数多くの利用分野（例えば、大量の高度に複製なゲノムDNAが存在する中での中サイズの断片的増幅）において、プロセッシング可能性の低下はPCRの最適化を単純なものにし、高い酵素濃度での特異性の強化に寄与する可能性がある。5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を除去するいくつかの突然変異は、熱安定性DNAポリメラーゼのプロセッシング可能性を減少させず強化させる可能性があり、従ってこれらの突然変異体酵素がその他の利用分野（例えば長いPCR生成物の生成）においては好ましい可能性もある。5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を除去するいくつかの突然変異は、同時に、野性型との関係において、突然変異体の熱安定性ポリメラーゼの耐熱性を高め、従ってこれらの突然変異体酵素は、G+Cが豊富な又はその他の形で変性が困難な断片的増幅においてさらに有効である。

熱安定性DNAポリメラーゼゲノムの特定の共通領域又はドメインが、酵素の5'→3'エキソヌクレアーゼに突然変異誘発が影響を及ぼすのに好ましい部位として同定された。これらのドメインを単離し、そして天然の5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を全く又はほとんどもたない熱安定性DNAポリメラーゼの中に挿入して、その活性を増強することができる。かくして、変更された5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を有するキノ熱安定性DNAポリメラーゼを製造する方法も本発明に包含される。

#### 発明の詳細な説明

本発明は、5'→3'エキソヌクレアーゼの発現を変えるべく突

とを意味する。ポリペプチドは、酵素活性が保持されるかぎり全長のコード配列により又はコード配列のいずれか一部分によってコードされる。

「作動的に連鎖された」(operably linked) という語は、制御配列がコード配列によってコードされたタンパク質の発現を駆動するために機能することになるようなコード配列の位置づけのことである。従って、制御配列に対し「作動的に連鎖された」コード配列というのは、コード配列が制御配列の指令の下で発現されるような配置のことである。

熱安定性ポリメラーゼを含む混合物に関連する場合の「混合物」という語は、望ましい熱安定性ポリメラーゼを含むがその他のタンパク質も同時に含む材料の収蔵物のことを意味する。望ましい熱安定性ポリメラーゼが組織宿主細胞に由来する場合、その他のタンパク質は通常宿主に関連するものである。宿主が細菌宿主である場合、汚染タンパク質は当然のことながら細菌性タンパク質となる。

「非イオン重合体洗剤」という語は、本発明においては約3.5乃至約9.5好ましくは4〜8.5のpH範囲で熱安定性ポリメラーゼ酵素を安定化させる能力によって特徴づけられる、イオン電荷を全くもたない界面活性剤のことを指している。

ここで使用する「オリゴヌクレオチド」という語は2つ以上好ましくは3つ以上通常は10以上のデオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチドから成る分子として定義づけされる。正確なサイズは数多くの要因によって左右されるが、これらの要因はそれ自体オリゴヌクレオチドの究極的機能又は用途によって左右されるものである。オリゴヌクレオチドは合成的にでも又クローニングによってでも誘導することができる。

突然変異を受けた熱安定性DNAポリメラーゼをコードするDNA配列及び発現ベクターを提供する。本発明の理解を容易にするため、いくつかの用語を以下で定義づける。

「細胞」、「細胞系」及び「細胞培養物」という語は、互換性ある形で使用でき、このような呼称は全て子孫を含んでいる。従って、「形質転換体」又は「形質転換された細胞」という語は、トランスファ（転移）の回数を問わず、最初に形質転換された細胞及びこの細胞から誘導された培養物を含んでいる。意図的な又は偶然の突然変異のため、全ての子孫がDNA含有量について正確に同一とは限らない。当初形質転換された細胞内でスクリーニングされたのと同じ機能性をもつ突然変異体子孫が、この形質転換体の定義中に含まれる。

「制御配列」という語は、特定の宿主生物体の中で作動的(operable)に連鎖されたコード配列の発現に必要なDNA配列のことを意味する。例えば、原核生物に適した制御配列には、プロモータが含まれ、任意のものとしてオペレータ配列、リボソーム結合部位及び可能性あるものとしてその他の配列が含まれる。真核細胞は、プロモータ、ポリアデニル化シグナル及びエンハンサを使用することが知られている。

「発現系」という語は、作動的な連鎖の中に所望のコード配列及び制御配列を含み、そのためこれらの配列によって形質転換された宿主がコードされたタンパク質を生産することができるようにしているDNA配列のことを意味する。形質転換を実行するためには、発現系はベクター上に含有されていいてよい；しかしながら、関連DNAが宿主染色体に組込まれていいてよい。

「遺伝子」という語は、回収可能な生物活性ポリペプチド又は前駆物質の生産に必要な制御配列及びコード配列を含むDNA配列のこ

こで使用する「プライマ」という語は、プライマ延長が開始される条件下に置かれたとき、合成開始点として作用することのできるオリゴヌクレオチドのことを言う。オリゴヌクレオチド「プライマ」は、純化された制限消化物の中といったように天然にも発生しうるが、合成で生産することもある。複製に相補的なものであるプライマ延長生成物の合成は、4つの異なるヌクレオシド三磷酸及び1つの熱安定性ポリメラーゼ酵素が適切な緩衝液内で適当な濃度で存在する中で開始される。「緩衝液」の中には、望ましいpHに調整された状態で補因子（例えば二価金属イオン）及び塩（適切なイオン強度を提供するため）が含まれる。

プライマは、増幅における最大効率を得るため一本鎖であるが、代替的には2本鎖であってもよい。2本鎖である場合、プライマは、延長生成物を調整する前にまずその鎖を分離する処理を受ける。プライマは通常オリゴデオキシリボ核酸である。プライマはポリメラーゼ酵素が存在する中で延長生成物の合成を起動させるのに充分長いものでなくてはならない。プライマの正確な長さは、プライマ供給源及び望まれる結果といった数多くの要因によって左右され、反応温度は、酵素に対するプライマの適切なアニリングを確保するべくプライマの長さ及びヌクレオチド配列に応じて調整されなくてはならない。標的配列の複雑性に応じて、オリゴヌクレオチドプライマは概率的に15〜35のヌクレオチドを含んでいる。短かいプライマ分子は一般に、酵素と充分に安定した複合体を形成するのに比較的低い温度を必要とする。

プライマは、酵素の特定の配列の1つの鎖に対し「実質的に」相補的となるように選択される。プライマは、プライマの伸長が起こるために鎖型鎖とハイブリッド形成するのに充分相補的でなくてはならない。プライマ配列が鎖型の正確な配列を反映している必要は

ない。例えば、非相補ヌクレオチドフラグメントをプライマの5'末端に付け、プライマ配列の残りの部分は実質的にその中に相補的であることが可能である。プライマ配列がハイブリッド形成しかくしてプライマの延長生成物の合成のための誘型プライマ複合体を形成するのに十分な相補性を誘型の配列との間に有することを条件として、プライマの中に非相補的配基又は比較的長い配列を点在させることが可能である。

「制限エンドヌクレアーゼ」及び「制限酵素」という語は、2本鎖DNAを特定のヌクレオチド配列又はその近くにて切断する制限性酵素のことを意味する。

「熱安定性ポリメラーゼ酵素」という語は、熱に対して安定し、耐熱性を有し、誘型模範に対して相補的なプライマ延長生成物を形成するのに適切な要領でヌクレオチドの結合に触媒として作用する（容易にする）酵素のことを意味する。一般に、プライマ延長生成物の合成はプライマの3'末端で始まり、合成が終結するまで誘型模範に沿って5'方向に進む。

本発明の理解をさらに容易にするため、本発明の広い概念を例示するため明細書全体を通して特定の熱安定性DNAポリメラーゼ酵素が参考として示されているが、これらの参考は本発明を制限する意図をもつものではない。頻繁に言及されている特定の酵素は、明細書で使用されることになる共通の略号及びそのそれぞれのヌクレオチド及びアミノ酸配列の配列番号と共に、以下に記されている。

| 熱安定性DNA<br>ポリメラーゼ             | 共通の<br>略号 | SEQ. ID. No.<br>(配列番号) |
|-------------------------------|-----------|------------------------|
| <i>Thermus aquaticus</i>      | Taq       | 配列番号: 1 (auc)          |
| <i>Thermotoga maritima</i>    | Tma       | 配列番号: 2 (a.a.)         |
| <i>Thermus</i> 種 sps 17       | Tsp17     | 配列番号: 3 (auc)          |
| <i>Thermus</i> 種 Z05          | TZ05      | 配列番号: 4 (a.a.)         |
| <i>Thermus thermophilus</i>   | Tth       | 配列番号: 5 (auc)          |
| <i>Thermococcus africanus</i> | Taf       | 配列番号: 6 (a.a.)         |
|                               |           | 配列番号: 7 (auc)          |
|                               |           | 配列番号: 8 (a.a.)         |
|                               |           | 配列番号: 9 (auc)          |
|                               |           | 配列番号: 10 (a.a.)        |
|                               |           | 配列番号: 11 (auc)         |
|                               |           | 配列番号: 12 (a.a.)        |

以上で要約したように、本発明は、天然ポリメラーゼの活性から変更された5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を示す熱安定性DNAポリメラーゼに関する。従って、本発明のポリメラーゼは、天然ポリメラーゼの活性から強化された5'→3'エキソヌクレアーゼ活性又は低下した5'→3'エキソヌクレアーゼ活性のいずれかを示す。

#### 低下した5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を有する熱安定性DNAポリメラーゼ

DNAポリメラーゼはしばしば多機能性を有する。ヌクレオチドの重合に加えて、大腸菌 (*E. coli*) DNAポリメラーゼ I (pol. I) は、例えばDNAのピロリン酸分解ならびにホスホジエステル結合の加水分解に触媒として作用する。pol. Iについてはこのような加水分解活性が2つ特徴づけられている：その1つは3'→5'エキソヌク

レアーゼ活性であり、もう1つは5'→3'エキソヌクレアーゼ活性である。2つのエキソヌクレアーゼ活性はpol. I分子の異なる2つのドメインと関連づけられる。しかしながら、pol. Iの5'→3'エキソヌクレアーゼ活性は、熱安定性DNAポリメラーゼの5'→3'エキソヌクレアーゼ活性が自ら作用を及ぼす基質に対しより厳しい構造的要件を有するという点で、この熱安定性DNAポリメラーゼのものとは異なる。

熱安定性DNAポリメラーゼの5'→3'のエキソヌクレアーゼ活性についての適切な感度の高い検定は、活性の構造的要件の発見を利用している。この検定の設計の重要な特徴は、模範された下流オリゴヌクレオチドプローブのエキソヌクレアーゼ開裂のために適切な形でポリメラーゼを位置づける上流のオリゴヌクレオチドプライマである。重合-非依存性エキソヌクレアーゼ活性の検定（すなわちデオキシヌクレオチド三磷酸が無い状態で行なわれる検定）については、プローブは、誘型に対し相補的なプローブの領域がプライマの3'末端に直接隣接するような形で位置づけられなくてはならない。さらに、プローブは、誘型に対して相補的でない少なくとも1つ、好ましくは2-10の又は最も好ましくは3-5のヌクレオチドをプローブの5'末端に含んでいるべきである。誘型に対してアニーリングされた時プライマとプローブの組合せは、ニックの3'-ヒドロキシル5'及びニックの置換された一本鎖3'を伴うニックを含む2本鎖構造を作り出す。あるいは、検定は、重合依存性反応として行なうことができる。この場合、各々のデオキシヌクレオチド三磷酸が1μM-2mM好ましくは10μM-200μMの濃度で含まれるべきであるが、ただし、誘型配列によって命じられる通りに、制限されたdNTPの添加（従って、制限されたdNTPの含有）が関与する可能性もある。dNTPが存在する中で検定が行なわれる場合、必要

な構造的条件は、ポリメラーゼによる誘型の相補的模範の合成を誘導するための上流のオリゴヌクレオチドプライマ、及び上流プライマを延長する過程においてポリメラーゼによる接触を受けることとなる模範づけされた下流のオリゴヌクレオチドプローブである。重合-非依存性熱安定性DNAポリメラーゼ5'→3'エキソヌクレアーゼ検定の一例が、以下に記されている。

合成3'リン酸化オリゴヌクレオチドプローブ（ポリメラーゼ延長を排除するためにリン酸化されたもの）BN33 (GATCGCTGGCGTAAC CAGGACAGCGCGCCGCGCp) (配列番号: 13) (100pmol)を、ガンマー (100P) ATp (3000Ci/mmol)及びT4ポリヌクレオチドキナーゼにより5'末端において100P-標識した。反応混合物をフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコールで抽出し、その後エタノール沈澱を行なった。100P標識されたオリゴヌクレオチドプローブを100μLのTE緩衝液内に再溶解させ、取り込まれなかったATPをSephadex G-50 スピニングカラム上でのゲル濾過クロマトグラフィによって除去した。100P標識されたBN33プローブ5pmolを、10mMのトリス-HCl (pH 8.3)、50mMのKCl及び3mMのMgCl<sub>2</sub>を含む100μLの反応混合物中で5pmolの合成オリゴヌクレオチドプライマBN37 (CGCGTAGGGCGCTGCGAAGTGT AGCGGTCA) (配列番号: 14)の存在下で5pmolの一本鎖H13sp10w DNAにアニーリングした。アニーリング混合物を5分間95℃まで加熱し、10分間70℃で冷却し、さらに10分間70℃で保温し、次に30分間Perkin-Elmer Cetus DNAサーマルサイクラーの中で25℃まで冷却した。10μLのアニーリング混合物を含むエキソヌクレアーゼ反応混合物を1分間70℃で予備保温した。予備保温反応物に2.5μLの標識熱安定性DNAポリメラーゼ酵素 (DNAポリメラーゼ活性約0.01-1単位、又は0.005-0.05pmolの酵素)を加え、反応混合物を70℃で保温した。1分及び5分後にアリコート (5μL)を取り出し、

1 μl の60 mM EDTA を添加して停止させた。反応生成物をホモクロマトグラフィーで分析し、オートラジオグラフィに従ってエキソヌクレアーゼ活性を数量化した。Polygram CEL3000EAE セルロース薄層クロマトグラフィー板上で7 M の尿素中2 % の部分的に加水分解された標的RNA を含むホモクロマトグラフィー混合物中で、クロマトグラフィーを行なった。5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性が存在する結果、<sup>32</sup>P 標識されたオリゴマーが生成されることになり、このオリゴマーはTLC 板を上へ移動し、オートラジオグラム上で、原点にとどまっている未分解プローブから容易に区別される。

熱安定性DNA ポリメラーゼの5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性は、二本鎖DNA の5' 末端領域を切除し、逐次的に5' -モノー及びオリゴヌクレオチドを解放する。エキソヌクレアーゼのための好ましい基質は、除去された(displaced) 一本鎖DNA であり、ここで、除去された(displaced) 一本鎖DNA と二重らせんDNA の間ではホスフォジエステル結合の加水分解が発生している。好ましいエキソヌクレアーゼ切断部位は、2重らせん領域内のホスフォジエステル結合である。従ってエキソヌクレアーゼ活性は、構造依存型一本鎖エンドヌクレアーゼ(SSSB) としてより良く描写することができる。

Isp1, Isp17, Isp17, I205, Ith及びIafを含め数多くの熱安定性ポリメラーゼがこの5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性を示す。5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性を有する熱安定性ポリメラーゼがPCR 法において利用される場合、生産される生成物の量の制限、長いPCR 生成物を生成するか又は有意な二次構造を含む領域を増幅する能力の障害、シャドウバンドの生成又はDNA 配列決定中の望ましい終結バンドの信号強度の低下、2本鎖プライマー-鋳型複合体の状況内でのオリゴヌクレオチドプライマーの5' 末端の分解、オリゴヌクレオチド誘導突然変異誘発中のニクトランスレーション合成、及び

DNA : DNA ハイブリッドのRNA 成分の分解、を含むさまざまな望ましくない結果が観察されている。

生成されたPCR 生成物の量の制限は、そうでなければ指数的な生成物 蓄積におけるプラトー現象のせいである。このようなプラトー現象は、一部には、5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性を伴うポリメラーゼがPCR 基質上でフォーク状構造と遭遇したとき5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性がホスフォジエステル結合の開裂又は加水分解をひき起こすために起こるものである。

このようなフォーク状構造は一般に成る種のG及びCが豊富なDNA 鋳型の中に存在する。これらの状況下でのこれらのホスフォジエステル結合の開裂は、PCR 法によるある種のG-及びCが豊富な領域の増幅を排除することから、望ましくないものである。さらにホスフォジエステル結合の開裂は同様に、生成物の鎖長及び再生物産がフォーク状構造高質を生じさせる場合にPCR の後期サイクルの生成におけるプラトー現象にも寄与する。

DNA 配列決定の状況下で、DNA 延長反応中のホスフォジエステル結合の開裂が「熱停止」をひき起こすことから、DNA ポリメラーゼの5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性はここでもフォーク状構造の鋳型で障害となる。一方これらの「熱停止」はシャドウバンドに寄与し、極端な場合には、正確且つ解釈が可能な配列データが不在をもたらす。

2本鎖プライマー-鋳型複合体と共にPCR 法で利用された場合、DNA ポリメラーゼの5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性は、オリゴヌクレオチドプライマーの5' 末端の分解をもたらす。この活性は、PCR において望ましくないものであるばかりでなく第2鎖cDNA合成及び配列決定法においても望ましくない。

最適な効率のオリゴヌクレオチド誘導突然変異誘発法の関、使用

されるDNA ポリメラーゼは、鎖除去(strand-displacement) 合成及び/又はニクトランスレーション能力を有してはならない。従って、オリゴヌクレオチド誘導突然変異誘発に用いられるポリメラーゼにおける5' → 3' のエキソヌクレアーゼ活性の存在も又同様に望ましくないことである。

最後に、ポリメラーゼの5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性は一般に同様に固有のRNase H 活性も含んでいる。しかしながら、RNA : DNA ハイブリッドを含むPCR 法におけるようにポリメラーゼが逆転写酵素としても使用されなくてはならない場合、このような固有のRNase H 活性は不利なものでありうる。

従って、本発明の一態様には、大幅に減少もしくは低下された又は完全に除去された5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性を示す熱安定性DNA ポリメラーゼ変異体の生成が含まれる。このような変異体熱安定性DNA ポリメラーゼは、PCR、第2鎖cDNA合成、配列決定及びオリゴヌクレオチド誘導突然変異誘発といった方法において使用するのにより適切かつ望ましいものとなるだろう。

5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性が低下又は除去された熱安定性DNA ポリメラーゼ変異体の生産は、部位特異的突然変異誘発及び欠失突然変異誘発といった方法によって達成できる。

例えば、Isp DNAポリメラーゼのアミノ酸配列内の残基46におけるGly のコドン第2の位置でのGからAの部位特異的変異(すなわちDNA 配列におけるC (127)から(A)の変異)は、5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性の約1000分の1の減少をもたらす。ポリメラーゼ活性、プロセッシング可能性又は延長速度には見かけの変化が全く無いということがわかった。Isp DNAポリメラーゼのヌクレオチド配列のこの部位 異変はGly (46)からAsp へのアミノ酸変換をもたらす。

Isp DNAポリメラーゼのグリシン46はテルムス (Thermus) スペーシspsal70DNAポリメラーゼ内で保存されているが、残基43に位置しており、同じGly からAsp への変異はIsp17DNA ポリメラーゼの5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性に対し同様の効果をもつ。Ith(Gly46)、I205 (Gly46)、Isp17 (Gly37) 及びIaf(Gly37) DNA ポリメラーゼの保存されたGly のAsp へのこのような変異は、これらのポリメラーゼの5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性に対しても類似の低下効果をもつ。

Isp17 Gly43, Ith Gly46, I205 Gly46, Isp17 Gly37及びIaf Gly37は、同様に、保存されたA (V/T) YG (配列番号: 15) 配列ドメイン内にも見いだされ、いずれのポリメラーゼのこの保存された配列ドメイン内でのグリシンのアスバラギン酸への変化も5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性を低下されることが予想される。具体的に言うと、Isp17 Gly43, Ith Gly46, I205 Gly46, 及びIaf Gly37はATTC配列ドメインを共有し、Isp Gly37はATTCドメイン内に見出される。保存されたA (V/T) YG (配列番号: 15) ドメインを含むその熱安定性DNA ポリメラーゼにおけるグリシンからアスバラギン酸への変異は、Ispポリメラーゼの部位特異的突然変異誘発のために用いられるものと同じ原理及び技術を利用して達成される。このような部位特異的突然変異誘発技術の例としては、1990年5月15日付出願の米国出願第 528,394号の例5、1991年9月27日付出版の弁理士事件整理番号第2583.1号の例4、1989年12月22日付出版の米国出願第 455,967号の例4及び5、ならびに1991年8月13日付のPCT 出願第91105753号の例5及び8がある。

このような部位特異的突然変異誘発は一般に、部位特異的プライマー誘導突然変異誘発によって達成される。この技術は現在当該技術分野において標準的なものであり、望まれる突然変異を誘発する制限された鎖

対合を除いて突然変異誘発されるべき一本鎖ファージDNA に対し相補的な合成オリゴヌクレオチドプライマを用いて行なわれる。簡単に言うと、プラスミド又はファージに対し相補的な鎖の合成を誘導するためのプライマとして、合成オリゴヌクレオチドが用いられ、得られる2重鎖DNA は、ファージ支持宿主細胞に形質転換される。形質転換された細胞の培養は、ファージを宿主細胞からのプラーク形成を可能にする上部寒地培地内で平板培養されるか或いは又、プラスミドベクターのための菌物選択的培地上で平板培養される。

理論的には、新しいプラークの50%が一本鎖として変異された形質を有するファージを含み、50%はもとの配列を有する。プラークはニトロセルロースフィルターに移送され、「リフト」は、正確な対合のハイブリッド形成を可能にするがもとの鎖との誤対合がハイブリッド形成を妨げるのに充分であるような温度で、キナーゼ付加された合成プライマとハイブリッド形成させられる。次に、プローブとハイブリッド形成するプラークが採取され、培養され、そしてDNA が回収される。

以下に記述する構成においては、プラスミド構成のための正しい連結は、連結混合物で大腸菌 (*E. coli*) DG98, DG101, DG116、又はその他の適切な宿主をまず形質転換することによって確認される。成功した形質転換体は、当該技術分野において理解されているように、プラスミド構成の様式に応じて、アンピシリン、テトラサイクリンその他の抗生物質耐性によって、或いは又その他の標識を用いて選択される。次に形質転換体からのプラスミドを、Clewett, D.B. 他、*Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* (1969年) 52: 1159の方法に従って、又任意にはクロラムフェニコール増幅 (Clewett, D.B., *J. Bacteriol.* (1972年) 110: 667) に従って増殖する。次に、分離されたDNA は制限酵素により分析され、そして/又は、Hessing、

他の *Nucleic Acid. Res.* (1981年) 9: 309 又は Haxan その他の *Methods in Enzymology* (酵素化学方法 (1981年) 65: 499) によってさらに記述されているように、Sanger, P., 他、*Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* (1977年) 74: 5463 のジデオキシ (チェーンターミネータ) 法によって配列決定される。

クローニング及び配列決定のため及びほとんどの *lac* 又は *P<sub>6</sub>* プロモータの制御下での構成の発現のためには、大腸菌 (*E. coli*) DG98, DG98, DG101, DG116 を宿主として用いた。 *P<sub>6</sub> M<sub>100</sub>* プロモータの制御下での発現のためには、大腸菌 (*E. coli*) K12 MC1000 ラムダ溶原株、W<sub>1</sub>W<sub>2</sub>sc1857 *Sus P<sub>6</sub>*, ATCC39531 を使用することができる。ここで、変更された5'→3' エキソヌクレアーゼ活性をもつ熱安定性DNA ポリメラーゼの発現のために用いられる宿主の例としては、1987年4月7日にATCCに寄託された (ATCC53606) *E. coli* DG116 及び1985年3月29日にATCCに寄託された (ATCC53075) *E. coli* K12 がある。

M13ファージ組換え体としては、大腸菌 (*E. coli*) K12菌株DG98 といったようなファージ感染を受ける可能性のある大腸菌 (*E. coli*) 菌株が使用される。DG98菌株は、1984年7月13日にATCCに寄託され、39768 という受入れ番号をもつ。

哺乳動物の発現は、COS-7, COS-A2, CV-1 及びマウス細胞内で達成され、昆虫細胞ベースの発現はスポドプテラ・フルギペイダ (*Spodoptera frugiperda*) 内で達成される。

本発明の熱安定性DNA ポリメラーゼは一般に、プラスミドPFL5G33 の特徴を含む大腸菌 (*E. coli*) DG116 から純化される。一次的特徴は、温度調節されるプロモータ (*AP<sub>6</sub>* プロモータ)、温度調節されるプラスミドベクター、正のレトロレギュレーション (*retro-regulatory*) 要素 (PR2) (1981年5月19日付発行の米国特許第

4,666,848号参照) 及び熱安定性DNA ポリメラーゼ遺伝子の変異形質である。米国特許出願第 455,967号明細書の46ページに記載されているように、pLSG33は、pLSG24の *Hind*III-*Bam*HI 制限フラグメントを発現ベクターDG178に連結することによって調製された。得られたプラスミドはアンピシリン耐性を持ち、本発明の熱安定性DNA ポリメラーゼの5'→3' エキソヌクレアーゼ欠損形質を発現することのできるものである。10リットルの発酵用の種母フラスコは、トリプトン (20g/l)、イーストエキス (10g/l)、NaCl (10g/l) 及び 0.005%のアンピシリンを含んでいる。種母フラスコは、寒地培地板からのコロニーから接種されるか或いは又、凍結したグリセロール保存培養物を用いることも可能である。種母は0.5~1.0 0.0. (A<sub>600</sub>)まで増殖させられる。発酵内へ接種される種母培養物の量は、細菌の最終濃度がリットルあたり1mgの乾燥重量となるように計算される。10リットルの増殖培地には、25mMのKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、10mMの (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、4mMのぐえん酸ナトリウム、0.4mMのFeCl<sub>3</sub>、0.04mMのZnCl<sub>2</sub>、0.03mMのCoCl<sub>2</sub>、0.03mMのCuCl<sub>2</sub> 及び0.03mMのH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> が含まれている。以下の無菌成分が付加される：4mMのH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、20g/lのグルコース、20mg/lのチアミン-HCl 及び50mg/lのアンピシリン。pHはNaOHで6.8に調整され、NH<sub>4</sub>OH の添加によって発酵中に制御された。グルコースは発酵中、NH<sub>4</sub>OH の添加と連係して連続的に添加される。発泡は、消泡剤として必要なだけポリプロピレングリコールを添加することによって制御される。溶存酸素濃度は40%に維持される。

発酵物は上述のように接種され、培養物は21 (A<sub>600</sub>)の光学濃度に達するまで30℃で増殖させられる。次に、望まれるポリメラーゼの合成を誘発するため温度を37℃まで上昇させる。誘発後8時間増殖を続行し、次に細胞は同流ろ過とそれに続く遠心分離を用いての

濾過によって収穫される。得られた細胞ペーストは-70℃で凍結され、約500グラムの細胞ペーストが得られる。相反する指示の無い限り、全ての精製段階は、4℃で行なわれる。

上述のようなプラスミドpLSG33を宿主凍結 (-70℃) 大腸菌 (*E. coli*) K12菌株DG116 又はその他の適切な宿主の一部分を一晚-20℃にまで暖める。細胞ペレットに対し、次の試薬を付加する：1体積の2×TE (100mMのトリス-HCl, pH7.5, 20mMのEDTA)、1mg/mlのロイペプチン及び144mMのPHSF (ジメチルホルムアミド中)。ロイペプチンの最終濃度は1mg/mlであり、PHSFについては2.4mMであった。好ましくは、ジチオトレイトール (DTT) をTE内に含めて1mM DTTの最終濃度を提供する。混合物は、混合機の中で低速で均質化される。使用に先立ち全てのガラス製品は乾燥しておき、精製に用いる溶液はできれば使用に先立って加圧滅菌しておく。細胞は10000psiでMicro fluidizerに2度通過させることによって破壊させる。

培養物は、細胞湿潤重量の5.5×の最終体積に至るまで、1mMのDTTを含む1×TEで希釈する。1mg/mlまでロイペプチンを添加し、2.4mMまでPHSFを添加する。最終体積 (分画1) は約1540mlである。

一般に硫酸アンモニウムを徐々に0.2M (26.4g/l) になるまで添加し、そして培養物を攪拌する。硫酸アンモニウムを添加した時点で、以下に記すポリエチレンジアミン (PEI) 沈降段階に先立って除去される沈降物が形成される。硫酸アンモニウム沈降物は、20分間14-14ロータの中で15000~20000 ×gで懸濁液を遠心分離することによって除去される。上澄みは、デカントされ保持される。次に硫酸アンモニウムの上澄みを、それが75℃に達するまで加熱プレート上で攪拌し、次に77℃の浴内に置き、そこで15分間場合によ

て操作を加えながら保持する。次に上澄みを氷浴の中で20℃まで冷却し、PEI 検定のため10mlのアリコートを取り出す。

0.3%のPEI(EDB からPolymia F として市販されている)が〜90%の高分子DNA 及びRNA を沈澱させる、すなわちいかなるDNA バンドもPEI 処理後の臭化エチジウムで染色されたアガロースゲル上に見えないということを確認するため、PEI 検定及びアガロースゲル電気泳動が用いられる。10%の保存液から 0.3%まで操作しながらゆっくりとPEI を加える。PEI 処理された上澄みを、JA-14 ロータ内で20分間、10000RPM(17000×g)にて遠心分離する。上澄みをデカントし、そして保持する。この体積(分画II)は約1340mlである。

分画IIを、0.2Mの硫酸アンモニウムを含むTEの6〜10カラム体積での平衡化後の2.6×13.3cm (71ml)のフェニルセファロスCL-4B (Pharmacia-LKB)カラム上に負荷する。このとき10cm/時の線形流速で分画IIを負荷する。流速は0.9ml/分である。カラムは、3カラム体積の平衡化緩衝液で洗浄し、次に2カラム体積のTEで洗浄して汚染する非DNA ポリメラーゼタンパク質を除去する。組換え型熱安定性DNA ポリメラーゼは、20%のエチレングリコールを含むTE中2.5M尿素4カラム体積で抽出する。標準的な手順に従って、光学的吸収(A<sub>260</sub>)、DNA ポリメラーゼ活性検定及びSDS-PAGEによって、DNA ポリメラーゼを含む分画を識別する。ピーク分画をプールし、そして0.2ミクロンの無菌真空ろ過装置を通してろ過する。体積(分画III)は約195mlである。メーカーの推奨事項に従って、樹脂を平衡化させそして再循環使用する。

1時間あたり1カラム体積で、6〜10カラム体積の0.05M HCl、50 mMのトリス-HCl、pH7.5、0.1MのEDTA及び0.2%のTween20により、2.6×13.75cm (93ml)のヘパリンセファロスCL-6Bカラム(Pharmacia-

LKB)を均質化させる。好ましくは、緩衝液は1mMのDTT を含んでいる。カラムは、3カラム体積の平衡化緩衝液で洗浄する。本発明の望ましい熱安定性DNA ポリメラーゼを、同じ緩衝液内で50-750mMのKCl 勾配の10カラム体積の直線勾配で抽出させる。無菌管内に分画(10分の1カラム体積)を収集し、望ましい熱安定性DNA ポリメラーゼを含む分画をプールする(分画IV、体積177ml)。

Amicon YN30 膜上で10mlまで分画IVを濃縮する。緩衝液交換のため、20mlまで濃縮器を満たし任意10mlまで体積を濃縮することによって、2.5×の貯蔵緩衝液(50mMのトリス-HCl、pH7.5、250mMのKCl、0.25MのEDTA、2.5mMのDTT 及び0.5%のTween-20)で5回、ダイアフィльтраーション(diafiltration)を行なう。濃縮器を空にし10mlの2.5×の貯蔵緩衝液で洗い出し、この緩衝液は濃縮物と合わさって分画Vを提供する。

残留DNA を除去するためには、陰イオン交換クロマトグラフィが用いられる。生物学的安全用フードの中で手順を行ない、無菌技術が用いられる。1秒あたり約5滴の速度で注射器を用いて30mlの2.5×貯蔵緩衝液で、0.2ミクロンの無菌使い捨て注射器先端部フィルタユニットを伴うウォーターズ(Waters) Sep-PakプラスDNA カートリッジを平衡化させる。使い捨て注射器を用いて、1秒あたり約1滴の割合でカートリッジ内に分画Vを通過させ、無菌管内に収集する。カートリッジを5mlの2.5×貯蔵緩衝液で流水洗浄し、空気で押し乾かす。80%のグリセロールで増強剤を1.5×に希釈し、-20℃で貯蔵する。得られる最終分画IVのプールは、変更された5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を伴う高活性熱安定性DNA ポリメラーゼを含んでいる。

スクレオチド配列の部位特異的変異誘発に加えて、熱安定性DNA ポリメラーゼの5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を低下させるた

め、欠失変異技術を使用することも可能である。このような欠失変異の一例としては、熱安定性DNA ポリメラーゼの保存されたA (V/T) YG (配列番号:15) ドメイン内のグリシンまで(グリシンを含めて)の全てのアミノ末端アミノ酸の欠失がある。

5'→3'エキソヌクレアーゼ活性に影響を及ぼす第2の欠失変異は、Iag DNAポリメラーゼ内のA1a77までの欠失である。このアミノ酸(A1a77)は、Iag DNAポリメラーゼの約85.5kDaのタンパク質分解生成物の中でアミノ末端アミノ酸として同定された。このタンパク質分解生成物は、いくつかの天然Iag DNAポリメラーゼ変異体の中で同定されており、タンパク質は安定しているように見える。このようなA1a77までの欠失はG1y46を含んでいることから、これはIag DNAポリメラーゼの5'→3'エキソヌクレアーゼ活性にも影響を及ぼす。

しかしながら、A1a77で始まる欠失変異体は、ヘプタドが安定状態にとどまることをタンパク質分解の証拠が示唆しているという点で、フェニルアラニン47で始まる欠失突然変異体と比較的利点をもつ。さらに、A1a77は、Iag DNAポリメラーゼ内の配列YKAよりもアミノ酸5個前の配列BEATG(配列番号:16)内に見出される。Ith DNAポリメラーゼ、I205 DNAポリメラーゼ及びIag17 DNAポリメラーゼ内には、類似の配列モチーフBEATG(配列番号:17)が見られる。アラニンは、保存されたモチーフYKAより5アミノ酸分前である。Iag A1a77に相当するその他の熱安定性DNA ポリメラーゼ例の中のアミノ酸は、Ith A1a78、I205 A1a78、Iag17 A1a74、Iag Leu72 及びIaf Ile73である。この配列を含むテルムス(Thermus)の種の熱安定性DNA ポリメラーゼ内モチーフBEAT (G/E)(配列番号:16又は配列番号:17)内のアラニン又は対応するアミノ酸までの欠失は、その5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を低下させ

であろう。5'→3'エキソヌクレアーゼモチーフYKAは同様にIag DNAポリメラーゼ(アミノ酸76-78)及びIaf DNAポリメラーゼ(アミノ酸77-79)の中に保存されている。この熱安定性ポリメラーゼ一族の中では、保存されたモチーフ(L/I) LET(配列番号:18)がYKAモチーフのすぐ前にある。Iaf DNAポリメラーゼIle73はこのYKAモチーフより残差5個分前であり、一方YKA DNAポリメラーゼLeu72は、YKAモチーフより残差5個分前にある。テルモタガ(Thermotoga)又はテルモシホ(Thermosiphon)属からの熱安定性DNA ポリメラーゼ内のモチーフ(L/I) LETYKA (配列番号:19)内のLeu又はIleの欠失は同様に5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を低下させるであろう。

かくして、テルムス(Thermus)属のDNA ポリメラーゼならびにテルモタガ(Thermotoga)及びテルモシホ(Thermosiphon)のDNA ポリメラーゼの5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を構成する保存されたアミノ酸配列が(L/I/L/A) X、YKA(配列番号:20)(なおここでXは3つのアミノ酸のいずれかの配列である)として同定された。従って熱安定性DNA ポリメラーゼの5'→3'エキソヌクレアーゼ活性は同様に、この保存されたアミノ酸ドメインを変異させることによって変えることができる。

当業者であれば、組換え宿主細胞内でこのような欠失変異体が発現される場合、メチオニンコドンがつねにコード配列の5'末端に置かれ、従って欠失変異体タンパク質のアミノ末端配列は上述のテルムス(Thermus)属内でDET-ALAとなる、ということがわかる。

欠失変異を行なうための好ましい技術には、熱安定性DNA ポリメラーゼのスクレオチド配列上の既知の制限部位の利用が含まれる。欠失すべき1又は複数のアミノ酸の同定に続いて、欠失されるべきアミノ酸又はドメインに対応する位置またはその位置に対し

わずかに3' 遠位の位置で標的DNA配列の開裂をひき起こすがしかし望まれるポリメラーゼのその他性をコードするドメインを、開裂された時に保持するような制限部位が同定される。

あるいは、標的アミノ酸又はドメインをコードする配列のいずれかの側(5'又は3')上の制限部位を利用してその配列を開裂させることも可能である。しかしながら、この場合、次に配列の2つの望ましい部分の連結が必要となる。この連結は、当該技術分野では標準的なものであり1990年5月15日出願の米国特許第523,394号の例9、1991年8月13日出願のPCT出願明細書第91/05753号の例7、及び1990年9月28日出願の米国特許出願第590490号に例示されている技術を用いて行なうことができる。

熱安定性DNAポリメラーゼの欠失変異を達成するためのもう1つの技術は、PCR変異誘発法を利用することによるものである。この方法においては、制限部位ドメイン及び任意的にはメチオニンコドンがすでに存在していない場合このコドンを取り込むプライマが開裂される。かくして、このプライマによるPCR生成物は、酵素の5'→3'エキソヌクレアーゼ活性をコードするドメインを除去するべく適切な制限酵素で消化される。次に、生成物の2つの残りの部分が連結されて、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性の欠如した熱安定性DNAポリメラーゼのためのコード配列が形成される。このようなコード配列は、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性の欠如した望ましい熱安定性DNAポリメラーゼを生産するため適切な宿主細胞内で発現ベクターとして利用できる。

減少した5'→3'エキソヌクレアーゼ活性をもつ $I_{aa}$  DNAポリメラーゼ変異体に加えて、減少された5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を有する末端切除された $I_{aa}$  DNAポリメラーゼを、 $I_{aa}$  DNAポリメラーゼ遺伝子の完全なコード化配列が大腸菌(*E. coli*)内

の発現ベクター内に存在している場合でさえ組換え技術によって生産できるということも見出された。このような実験が切斷された $I_{aa}$  DNAポリメラーゼは、位置140のメチオニンコドンで出発する翻訳によって形成される。さらに組換え手段を用いて、 $I_{aa}$ コード配列の位置284でのメチオニンコドンにおいて翻訳を開始することにより生産されたタンパク質に相当する末端切除されたポリメラーゼを生産することが可能である。

アミノ酸1-139の欠如した $I_{aa}$  DNAポリメラーゼ(約86kDa)及びアミノ酸1-283の欠如した $I_{aa}$  DNAポリメラーゼ(約70kDa)は、ポリメラーゼ活性を保持しているが、低下した5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を有する。70kDaの $I_{aa}$  DNAポリメラーゼの付加的な利点は、それが未変性の $I_{aa}$  ポリメラーゼに比べて有意に熱安定性があるという点にある。

かくして無数の $I_{aa}$  DNAポリメラーゼ1酵素の全配列が活性のために必要とされることはないということがわかった。 $I_{aa}$  DNAポリメラーゼ1コード配列の一部を組換えDNA技術の中で用いてDNAポリメラーゼ活性をもつ生物学的に活性の遺伝子生成物を生産することが可能である。

さらに、 $I_{aa}$  DNAポリメラーゼ配列をコードするDNAの利用可能性は、同様にDNAポリメラーゼ活性をもつが低下した5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を有するミューテン(変異体タンパク質)形態を生産するべくコード配列を変更する機会を提供する。 $I_{aa}$  DNAポリメラーゼのアミノ(N)末端部分はポリメラーゼ活性のために必要なものではないが、むしろタンパク質の5'→3'エキソヌクレアーゼ活性をコードする。

かくして、組換えDNA方法を用いて、 $I_{aa}$ 遺伝子のN末端コード配列のほぼ最高3分の1まで欠失させ、クローニングし、ポリメラ

ーゼ決定においてきわめて活性であるが欠失の範囲に応じて5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を全くもたない遺伝子生成物を発現することが可能である。ポリメラーゼのいくつかのN末端短縮形態が活性であることから、これらのポリメラーゼの発現のために用いられる遺伝子構成体は、コード配列の対応する短縮形態を含むことができる。

N末端欠失に加えて、 $I_{aa}$  DNAポリメラーゼ又はその他の熱安定性DNAポリメラーゼのペプチド鎖内の個々のアミノ酸残基を、酸化、還元又はその他の誘導体化によって変更することが可能であり、ポリメラーゼ活性を保持するが低下した5'→3'エキソヌクレアーゼ活性をもつフラグメントを得るためタンパク質を開裂することもできる。 $I_{aa}$  DNAポリメラーゼコード配列又はその他の熱安定性DNAポリメラーゼのコード配列の一次構造に対して欠失、付加又は変更により修正を行ない、そのコード配列から生産されたmRNAの翻訳中に熱安定性DNAポリメラーゼへと取り込まれるアミノ酸を変化させることは、タンパク質の高温DNAポリメラーゼ活性を破壊することなく行なうことができる。

低下した又は増強された5'→3'エキソヌクレアーゼ活性のごとき新規の性質を含む熱安定性DNAポリメラーゼを開裂するためのもう1つの技術は、「熱安定性キメラDNAポリメラーゼ」の構成のための「ドメインシャッフリング(混合)」技法である。例えば、 $I_{aa}$  DNAポリメラーゼ1コドン289-422に換えて約291-約484のコドンを含む $I_{aa}$  DNAポリメラーゼコード配列を用いることは、 $I_{aa}$  DNAポリメラーゼの3'→5'エキソヌクレアーゼドメイン(1-289)、 $I_{aa}$  DNAポリメラーゼの5'→3'エキソヌクレアーゼドメイン(291-484)及び $I_{aa}$  DNAポリメラーゼのDNAポリメラーゼドメイン(423-832)を含むような新規な熱安定性DNAポリメラーゼを生み出す

ことになる。あるいは、 $I_{aa}$  DNAポリメラーゼの5'→3'エキソヌクレアーゼドメイン及び3'→5'エキソヌクレアーゼドメイン(およそ、コドン1-484)を、 $I_{aa}$  DNAポリメラーゼのDNAポリメラーゼ(ATP結合及びプライマ/誘導結合ドメイン)部分(およそ、コドン423-832)に融合させることができる。

ここでわかるように、「ドメインシャッフリング」による「熱安定性キメラDNAポリメラーゼ」の生成のための供与体と受容体は $I_{aa}$ 及び $I_{aa}$  DNAポリメラーゼに制限される必要はない。その他の熱安定性ポリメラーゼは、 $I_{aa}$ 及び $I_{aa}$  DNAポリメラーゼと類似のドメインを提供する。その上、5'→3'エキソヌクレアーゼドメインは、変更された5'→3'ヌクレアーゼ活性をもつ熱安定性DNAポリメラーゼから誘導せられる。例えば、 $I_{aa}$  DNAポリメラーゼの1-289の5'→3'ヌクレアーゼドメインは、 $I_{aa}$  ポリメラーゼ遺伝子のGly(46)からAspへの変異体形態から誘導せられる。同様に、 $I_{aa}$  DNAポリメラーゼの5'→3'ヌクレアーゼ及び3'→5'ヌクレアーゼドメインは5'→3'エキソヌクレアーゼ欠損ドメインをコードし、 $I_{aa}$  Gly(37)→Aspアミノ酸1-484をコードするDNAフラグメント、又はこれに代えて末端切除形NotI40-アミノ酸484をコードするDNAフラグメントとして取出すことができる。

さまざまな手段のいずれを用いてもキメラDNAポリメラーゼコード配列(新しい特性をもつもの)を生産することができるが、好ましい方法は「オーバーラップ」PCRを利用する。この方法においては、寡配された連結部配列はPCRプライマ内(その5'末端で)に盛り込まれている。個々のドメインの初期増幅に続いて、さまざまな生成物が希釈され(約100-1000倍)、組合わせられ、変性され、アニーリングされ、延長され、その後、そうでなければ標準的なPCRのために最終的順方向及び逆方向プライマが付加される。

当質であれば、低下した5'→3'エキソヌクレアーゼ活性をもつ上述の絶安定性DNAポリメラーゼが組換えDNA技法によって最も容易に産生されるということを確認することだろう。低下した5'→3'エキソヌクレアーゼ活性をもつ本発明に係った変異体酵素の1つ又はこれらの酵素の誘導体又は相同体を産生したい場合、酵素の組換え体形態を生産することには、発現ベクターの構成、ベクターを用いた宿主細胞の形質転換及び発現が発生するような条件下での形質転換された宿主細胞の培養が、典型的には含まれる。

発現ベクターを構成するためには、成熟（ここでは全てのキメラ又はミューテインを含む）酵素又は、活性を破壊しない付加的な配列への又は活性タンパク質を与えるための（ペプチダーゼでの処理といった）制限された条件下で開裂可能な付加的な配列への変異体ポリメラーゼの融合をコードするDNAが得られる。次に、コード配列は、発現ベクター内で適当な制限配列との作動的連続状態に置かれる。ベクターは、宿主細胞内で自律的に複製するように、又は宿主細胞の染色体DNA内に組込まれるように設計され得る。適切な宿主を形質転換するためにこのベクターが用いられ、形質転換された宿主は、組換え型ポリメラーゼの発現に適した条件下で培養される。

前述の段階の各々はさまざまな方法で行なうことができる。例えば、ゲノムフラグメントから望ましいコード配列を得、これを直接適切な宿主内で使用することが可能である。さまざまな宿主内で作動的な発現ベクターのための構成は、以下に一般的に記述するようにレプリコン及び制御配列を用いて行なわれる。望ましいコード化及び制御配列を含む適切なベクターの構成は、当該技術分野において充分に理解されている標準的な連結及び制限技術を利用する。単離されたプラスミド、DNA配列又は合成オリゴヌクレオチドは開裂され、変更され、望ましい形に再連結される。適当な制限部位は、適

当得られない場合、以下に例示するように発現ベクターの構成を容易にするべくコード配列の端部に付加することが可能である。

部位特異的DNA開裂は、当該技術分野において一般に理解されており又市販の制限酵素のメーカーが規定しているような条件下で適当な制限酵素（1又は複数）で処理することによって行なわれる。例えばNew England Biolabs、製品カタログを参照のこと。一般に、約1µgのプラスミド又はその他のDNAが約20µLの緩衝液中で酵素1単位によって開裂される。以下の例では、DNAの完全な消化を確保するために過剰の制限酵素が使用されている。約37℃で約1時間から2時間の保温時間が標準的であるが、変更も許容できる。各保温の後、タンパク質はフェノール及びクロロホルムでの抽出により除去される。この抽出の後には、エーテル抽出及びエタノールでの沈殿による水性成分からのDNAの回収を行なうことができる。望ましい場合には、開裂された成分のサイズ分離を、標準技法を用いたポリアクリルアミドゲル又はアガロースゲル電気泳動法によって行なうことも可能である。例えばMethods in Enzymology, 1980年, 65: 499-560を参照のこと。

一本鎖の「突出」末端を有する制限開裂されたフラグメントは、50mMのトリス-HCl pH7.6, 50mMのNaCl, 10mMのMgCl<sub>2</sub>, 10mMのDTT及び5~10µMのdNTPの中で20℃~25℃、約15~25分の保温時間を用いて4つのデオキシスクレオシド三磷酸（dNTP）の存在下で大腸菌（*E. coli*）DNAポリメラーゼI（クレンウ）の大フラグメントで処理することにより、平滑末端（2本鎖末端）にすることができる。Klenowフラグメントは5'の突出末端でフィリインするが、たとえ4つのdNTPが存在する場合でも、突出する3'一本鎖をチューバックする。望ましい場合には、突出末端の性質によって課せられる制限条件の範囲内でdNTPsのうちの1つだけつまり選択されたも

のだけを供給することにより、選択的修飾を行なうことが可能である。Klenowでの処理の後、混合物はフェノール/クロロホルムで抽出され、エタノール沈殿される。S1ヌクレアーゼを用いた適切な条件下での処理は核酸の全一本鎖部分の加水分解をもたらすから、S1ヌクレアーゼを用いて類似の結果を達成することも可能である。

Hefterci他、1981, J. Am. Chem. Soc., 103: 3185-3191のトリエステル方法、或いは又自動合成方法を用いて、合成オリゴヌクレオチドを調製することが可能である。アニーリングに先立つ又は復元づけのための一本鎖のキナーゼ付加は、50mMのトリス、pH7.6, 10mMのMgCl<sub>2</sub>, 5mMのジチオトレイトール（DTT）、及び1~2µMのATPの存在下で0.5µMの基質に対し余剰の、例えば約10単位のポリヌクレオチドキナーゼを用いて達成される。キナーゼ付加がプローブの標識づけのためである場合、ATPは高い比活性のγ-<sup>32</sup>Pを含むことになる。

以下の標準的条件及び温度で15~30µLの体積で連結が行なわれる：20mMのトリス-HCl, pH7.5, 10mMのMgCl<sub>2</sub>, 10mMのDTT, 33µg/mLのBSA, 10mM~50mMのNaCl及び（相補的一本鎖末端を伴うフラグメントの連結のため）0℃で0.01~0.02（Kunital単位のT4 DNAリガーゼと40µMのATP、又は（「平滑末端」連結のため）14℃で0.3~0.6単位のT4 DNAリガーゼと1mMのATPのいずれか。相補的末端を伴うフラグメントの分子間結集は、通常33~100µg/mLの合計DNA濃度（5~100mMの合計末端濃度）で行なわれる。分子間結集結集（通常、任意で20~30倍のモル余剰リンカーを用いる）は、1µMの合計末端濃度で行なわれる。

ベクター構成において、ベクターフラグメントは一般に、5'リン酸を除去しベクターの再連結及び再構成を防ぐため、細菌又は子ウシの腸内アルカリ性ホスファターゼ（BAP又はCIAP）で処理され

る。BAP及びCIAP消化条件は当該技術分野において周知のものであり、公表されたプロトコルが通常、市販のBAP及びCIAP酵素に付随してくる。核酸フラグメントを回収するためには、構築物をフェノール-クロロホルムで抽出し、エタノール沈殿してホスファターゼを除去しDNAを精製させる。あるいは、適切な制限サイトが利用可能である場合、連結前後の制限酵素消化により、望ましくないベクターフラグメントの再連結を防ぐことができる。配列変更を必要とするコード配列又はベクターの一部分については、さまざまな部位特異的、プライマ誘導的な変異誘発方法が利用可能である。ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を、部位特異的な変異誘発を行なうために使用することが可能である。現在当該技術分野において標準的なものであるもう1つの技術においては、望まれる突然変異をコードする合成オリゴヌクレオチドが、変異誘発プライマの延長生成物の精製のために誘導として用いられるPBS 13'のごとき一本鎖ベクターの相補的核酸配列の合成を誘導するためのプライマとして用いられる。変異誘発されたDNAは、宿主細胞に形質転換され、形質転換された細胞の培養物はプレートされ同定される。変更されたベクターの同定には、ニトロセルロースフィルタ又はその他の膜に対する選択された形質転換体のDNAの移行、及び変更された配列に対する正確な対合のハイブリッド形成を可能にするがしかしもとの親とのハイブリッド形成を防げるような濃度でキナーゼ付加された合成プライマとハイブリッド形成された「リフト」が関与することが考えられる。プローブとハイブリッド形成するDNAを含む形質転換体が次に培養され、変更されたDNAの検出として役立つ。

以下に記される構成においては、プラスミド構成のため適正な連結は、まず連結混合物で大腸菌（*E. coli*）DG101又はその他の適切な宿主を形質転換することによって確認される。成功した形質

転換体は、当技術分野では周知の通り、プラスミド構成模式に応じて、アンピシリン、テトラサイクリン又はその他の抗生物質耐性又は感受性又はその他の遺伝子を用いることによって選択される。形質転換体からのプラスミドは次に、Cleveland 他、1969年、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 62: 1159の方法に従って、任意にはクロラムフェニコール増幅 (Cleveland, 1972年、*J. Bacteriol.* 110: 667)に従って調製される。プラスミドDNAを得るためのもう1つの方法は、Bethesda Research Laboratories刊行物Focus、第5巻、第2号の11ページに「塩基-酸」抽出方法として記述されており、プロトコルの段階12-17を、DNAのCaCl<sub>2</sub>/異化エチジウム超遠心分離で置き換えることによって、非常に純粋なプラスミドDNAを得ることができる。分離されたDNAは、制限酵素消化によって分析され、及び/又はHoesling 他、1981年、*Nuc. Acids Res.* 9: 309によってさらに評定されているようなSanger 他、1977年、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463のジデオキシ (チェーンターミネータ) 法によってか、或いは又Maxam 他、1980年、*Methods in Enzymology* 65: 499の方法によって配列決定される。

制御配列、発現ベクター及び形質転換方法は、遺伝子を発現するのに用いられる宿主細胞のタイプによって異なる。一般に、宿主としては、原核生物、酵母菌、昆虫又は哺乳動物の細胞が用いられる。原核生物の宿主は一般に、組換えタンパク質の生産のために最も効果的で便利なものであり、従って本発明の熱安定性DNAポリメラーゼの発現にとって好ましいものである。

組換え型タンパク質を発現するのに最も頻繁に用いられる原核生物は、大腸菌である。クローニング及び配列決定のためそして大部分の細菌性プロモータの制御下での構成の発現のためには、GCSC6135として大腸菌 (*E. coli*) 遺伝材料センタから入手でき

る大腸菌 (*E. coli*) H12株H294を宿主として使用することが可能である。Plasmid 制御配列を伴う発現ベクターについては、大腸菌 (*E. coli*) H12株HC1000ラムダ複製株、M.HaeclI, SmaI, PstI, ATCC39531を用いることができる。1987年4月7日にATCCに寄託された(ATCC53606) 大腸菌 (*E. coli*) DG116及び1985年3月29日にATCCに寄託された(ATCC53075)大腸菌 (*E. coli*) H2も同様に有用な宿主細胞である。M13ファージ組換え体については、大腸菌 (*E. coli*) H12株DG98といったファージ感染を受けやすい大腸菌 (*E. coli*) 株が使用される。DG98株は、1984年7月13日にATCCに寄託されている(ATCC39768)。

しかしながら、本発明の熱安定性DNAポリメラーゼの組換え体発現のためには、バチルス・スプテリス (*Bacillus subtilis*) などのかん菌、さまざまなシェードモナス (*Pseudomonas*) の種及びその他の細菌株といった大腸菌 (*E. coli*) 以外の微生物株も用いることができる。

このような原核生物系においては、宿主又は宿主と適合性ある菌から誘導された制御配列及び複製部位を含むプラスミドベクターが頻繁的に用いられる。

例えば、大腸菌 (*E. coli*) は典型的には、Boliver 他、1977年、*Gene* 2: 95によって記述されているpBR322の質体を用いて形質転換される。プラスミドpBR322はアンピシリン及びテトラサイクリン耐性のための遺伝子を含んでいる。これらの薬剤耐性遺伝子は、望ましいベクターを構成する上で保持することも破壊することもでき、従って望まれる組換え体の存在を検出する助けとなる。一般に使用されている制御配列、すなわち、リボソーム結合部位配列と共に任意には1つのオペレータを伴う転写開始のためのプロモータとしては、 $\beta$ -ラクタマーゼ (ベニシリナーゼ) 及びラクトース (*lac*) プ

ロモータ系 (Chang 他、1977年、*Nature* 266: 1056)、トリプトファン (*trp*) プロモータ系 (Goeddel 他、1980年、*Nuc. Acids Res.* 8: 4057) 及びラムダ終極型P、プロモータ (Shimatake 他、1981年、*Nature* 292: 128) 及びN-遺伝子リボソーム結合部位 (*Nas*) が含まれる。1987年12月8日付発行の米国特許第 4,711,845号に、ポータブル式制御システムカセットが記述されている。このカセットは、*Nas* 配列の6bp 3' 内の閉鎖を許容する少なくとも1つの制限部位をもつ第3のDNA配列の上流に位置する*Nas* に作動的に連結されたP、プロモータを含んでいる。同様に有効なのは、1986年10月8日に公示された欧州特許公開第 196,864号中にChang 他によって記述されているホスファターゼA (*phoA*) 系である。しかしながら、本発明の変更された熱安定性DNAポリメラーゼ発現ベクターを構成するためには、原核生物と適合性ある入手可能なあらゆるプロモータ系を用いることができる。

細菌に加えて、酵母のごとき真核微生物を組換え宿主細胞として使用することも可能である。

サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) の実験用株、つまりパン酵母菌が最も多く用いられるが、その他のいくつかの菌株も一般に入手可能である。2ミクロン複製起点を用いるベクターが一般的である (Broach, 1983年、*Math. Eng.* 101: 307) が、酵母での発現に適したその他のプラスミドベクターも知られている (例えば、Stinchcomb 他、1979年、*Nature* 282: 39; Tschopp 他、1980年、*Gene* 10: 167; 及びClark 他、1983年、*Math. Eng.* 101: 300を参照のこと)。酵母ベクターのための制御配列は、解糖系酵素の合成のためのプロモータが含まれている (Hess 他、1968年、*J. Adv. Enzyme Res.* 7: 149; Holland 他、1976年、*Biotec Anal.* 11: 4900; 及びHolland 他、1981年

*J. Biol. Chem.* 256: 1385)。当技術分野において知られているさらなるプロモータとしては、3-ホスフォグリセリン酸キナーゼのためのプロモータ (Hitzmann 他、1980年、*J. Biol. Chem.* 255: 2073)、及びグリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ビルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフラクトキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、3-ホスフォグリセリン酸ムターゼ、ビルビン酸キナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ及びグルコキナーゼといったその他の解糖系酵素のためのプロモータが含まれる。増殖条件によって制御される転写の付加的利点をもつその他のプロモータは、アルコールデヒドロゲナーゼ2、イソサイトクロムC、酸性ホスファターゼ、窒素代謝と関連する分解酵素、並びにマルトース及びガラクトースの利用を担う酵素 (Halland、前記) のためのプロモータ領域である。

コード配列の3' 末端に置かれたとき、ターミネータ配列も発現強化のために用いることができる。このようなターミネータは、酵母由来の遺伝子内のコード配列に続く3' 非翻訳領域内に見い出される。酵母適合性プロモータ、複製起点及びその他の制御配列を含むあらゆるベクターが、本発明の熱安定性DNAポリメラーゼのための酵母発現ベクターの構成に使用するのに適している。

本発明の熱安定性DNAポリメラーゼをコードするスクレオチド配列は、多細胞生物に由来する真核宿主細胞培養物の中でも発現される。例えば *Tissue Culture*, Academic Press, Cruz and Patterson, editors (1973年) を参照のこと。有用な宿主細胞系としては、Cos-7, Cos-A2, CV-1, マウス細胞例えばマウスの腎臓 NS1 及び VERO, HeLa細胞及びチャイニーズハムスターの卵巣 (CHO) 細胞が含まれる。このような細胞のための発現ベクターには、通、例えば

一般に用いられるシミアンウイルス40 (SV40) からの初期及び後期プロモータ (Flora 他, 1978年, *Nature* 273: 113) 又は、ポリオマウイルス、アデノウイルス2、ウシの乳頭腫ウイルス (BPV) 又は馬の肉腫ウイルスといったそのウイルス性プロモータ、又は免疫グロブリンプロモータ及びヒートショックプロモータといったような哺乳動物細胞と適合性ある制御配列及びプロモータが含まれる。BPV ベクター系を用いた哺乳動物系内でDNA を発現するための系は、米国特許第 4,419,446号の中で開示されている。この系の変形態様は、米国特許第 4,601,978号に記述されている。哺乳動物細胞宿主系形質転換の一般的観点、Azelの米国特許第4,399,216号に記述されている。「エンハンサー」領域も又、発現を最適化する上で重要である。これらは、一般にプロモータ領域の上流に見られる配列である。複製起点は必要とあらばウイルス性供給源から得ることができる。しかしながら、動物体内への感染は、真核生物内のDNA 複製にとって共通のメカニズムである。

植物細胞を宿主として利用することも、ノバリンシンターゼプロモータ及びポリプデニル化シグナル配列 (Depicker 他, 1982年, *J. Mol. Appl. Gen.* 1: 561) といった、植物細胞と適合性ある制御配列が利用可能である。バキテロウイルスベクターによって提供される制御系を用いた昆虫細胞を利用する発現系も同様に記述されている (Miller 他, 1986年, *Genetic Engineering* (Setlow 他, eds., Plenum Publishing) 2: 277-297)。昆虫細胞ベースの発現はスゴフブレラ・フルグベイダ (*Spodoptera frugiperda*) 内で達成できる。これらの系は、同様に本発明の組換え熱安定性ポリメラーゼを生産するのに用いることができる。

使用する宿主細胞に応じて、このような細胞に適切な標準の技術を用いて転写転換が行なわれる。Cohen, 1972年, *Proc. Natl.*

*Acad. Sci. USA* 69: 2110 により記述されているような塩化カルシウムを用いるカルシウム処理は、実質的な細胞壁バリヤを含む原核生物又はその他の細胞のために用いられる。或る種の植物細胞のためには、アグロバクテリウム・チュメファシエンシス (*Agrobacterium tumefaciens*) を用いる感染 (Shaw 他, 1983年, *Gene* 23: 315) が用いられる。哺乳動物の細胞 ためには、Graham and van der Eb, 1978年, *Virology* 52: 546のリン酸カルシウム法方法が好まれる。酵母への形質転換は、Van Solingen 他, 1977年, *J. Bact.* 132: 946及びOsiao 他, 1979年, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 3828の方法に従って行なわれる。

組換え宿主細胞内で、変更された5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性を有する望ましい熱安定性DNA ポリメラーゼがひとたび発現されると、タンパク質の精製が望まれる可能性がある。本発明の組換え熱安定性ポリメラーゼを精製するためにはさまざまな精製手順を用いることができるが、等しい純度の酵素調製物を生み出すためには、比較的少ない段階しか必要でない可能性がある。大腸菌 (*E. coli*) の宿主タンパク質は熱に敏感であることから、本発明の組換え熱安定性DNA ポリメラーゼは、粗液菌液を熱不活性化することによって著しく富化することができる。この段階は、宿主DNA からの熱安定性DNA ポリメラーゼの分離を確実にしない、熱安定性DNA ポリメラーゼとその他の細胞菌液タンパク質とのイオン相互作用を減少させるため、充分な量の塩 (通常的には 0.2~0.3 M の硫酸アンモニウム) の存在下で行なわれる。

さらに、0.3M の硫酸アンモニウムの存在は、フェニルセファロースカラムとの疎水性相互作用を促進する。疎水性相互作用クロマトグラフィは、疎水性基を含む未負荷のベッド材料との疎水性相互作用の強度の差に基づいて物質が分離される分離技術である。良

型的には、カラムはまず、高イオン強度のごとき疎水結合にとって有利な条件下で平衡化される。次に、試料を溶出させるため、下流する塩勾配を用いることができる。

本発明に従うと、(変更された5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性をもつ組換え型熱安定性DNA ポリメラーゼを含む) 水性混合物が、フェニルセファロース (Pharmacia 製) 又はPhenyl Tet (東ソー製)のごとき比較的強い疎水性ゲルを含むカラム上に負荷される。フェニルセファロースカラムとの疎水性相互作用を促進するため、0.3 M 以上の硫酸アンモニウム (0.3M が好ましい) 又は 0.5M 以上の NaCl を含む溶剤が用いられる。カラム及び試料は、同様に 0.5M の DTT を含む50mM の Tris (pH 7.5) 及び1.0M の EDTA (「TE」) 緩衝液の中で 0.3M の硫酸アンモニウムに調整され、試料はカラムに対し適用される。カラムは 0.3M の硫酸アンモニウム緩衝液で洗浄する。次に、減少する塩勾配、エチレンもしくはプロピレングリコール又は尿素のごとき疎水的相互作用を低下させる溶剤で、酵素を溶出させることができる。

長期にわたる安定性のためには、本発明の熱安定性DNA ポリメラーゼ酵素は、1又は複数の非イオン性ポリマー洗剤を含む緩衝液の中で保存することができる。このような洗剤は、一般に約100~250,000 ダルトン好ましくは約 4,000~200,000 ダルトンの範囲内の分子量を有するものであり、約 3.3~約9.5好ましくは約4~8.5 のpHで酵素を安定化させる。このような洗剤の例としては、McCutcheon Division of MC Publishing Co., 175 Rock Road, Glen Rock, NJ (USA) により発行された McCutcheon の Emulsifiers & Detergents (乳化剤と清浄剤) の 295~298 ページ及び1989年7月28日付の同係属米国出願第 387,003号に規定されているものが含まれる (これらの記載を引用により本明細書に組み入れる)。

好ましくは、洗剤はエトキシ化脂肪酸アルコールエーテル及びラウリルエーテル、エトキシ化アルキルフェノール、オクチルフェノキシポリエトキシエタノール化合物、修飾オキシエチル化及び/又はオキシプロピル化置換アルコール、モノオレイン酸ポリエチレングリコール化合物、ポリソルビン酸化合物及びフェノール脂肪酸アルコールエーテルを含むグループの中から選択される。より具体的には、ICI Americas Inc., Wilmington, DE からのポリオキシエチル化 (20) モノラウリン酸ソルビタンであるTween 20、及び BASF Wyandotte Corp., Parsippany, NJ からのエトキシ化アルキルフェノール (ノニル) である Igepal NP-40 が好ましい。

本発明の熱安定性酵素は、このような酵素の活性が必要であるか又は望まれるあらゆる用途に用いることができる。

Sanger ジデオキシヌクレオチド法によるDNA 配列決定 (Sanger 他, 1977年, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467) は近年、断片ベクター (Yanisch-Perron 他, 1985年, *Gene* 33: 103-119)、塩基類似体 (Mills 他, 1979年, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 2232-2235、及び Barr 他, 1986年, *Bio Technology* 4: 428-432)、酵素 (Tabor 他, 1987年, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 4763-4771 及び Iwata, H. A. 他, 1988年, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 9436: 9440) 及びDNA 配列分析の部分的自動化のための許諾 (Smith 他, 1986年, *Nature* 321: 674-679; Prober 他, 1987年, *Science* 238: 336-341; 及び Amersham 他, 1987年, *Nuc. Acids, Res.* 15: 4593-4603) の開発を含め、著しい改良を受けてきた。基本的なジデオキシ配列決定手順には、(1) 適切な一本鎖又は変性2本鎖DNA 模様にオリゴヌクレオチドプライマをアニリングすること; (2) 各々1つの d 置換 dNTP 又は ddNTP (代替的には、制限プライマを用いることができる)、未置換 dNTP の混合、及び1つ

の読み取りジデオキシヌクレオチド-5'-三磷酸(4dNTP)を含む4つの別々の反応においてDNAポリメラーゼでプライマを延長すること；(B)高解像度ポリアクリルアミド-尿素ゲル上で反応生成物の4組を分離すること；並びに(C)DNA配列を推定するための検査することのできるゲルのオートラジオグラフィ画像を生成すること、が含まれる。あるいは、反応生成物を同定するための蛍光標識プライマ又はヌクレオチドを用いることができる。既知のジデオキシ配列決定方法は、大腸菌(*E. coli*) DNAポリメラーゼIのクレノウフラグメント、逆転写酵素、*Taq* DNAポリメラーゼ又は変異T7 DNAポリメラーゼのごときDNAポリメラーゼを利用する。

市販のキットの導入はこの技術を大幅に簡略化し、DNA配列決定をあらゆる実験室にとっての日常的技術にした。しかしながらそれでもなお、パンドロームヘパビンループといった二次的構造を含む核酸及びG+Cの豊富なDNAでうまく機能する配列決定プロトコルに対する必要性が、当該技術分野には存在している。一本鎖DNAは、ヘパビンループといったような、延長反応における不適切な停止を通して又は5'-3'エキソヌクレアーゼ活性をもつ酵素の場合にはヘパビンの場合における錯型鎖の開裂を通してジデオキシ(チェーンターミネータ)配列決定プロトコルと著しく妨害する可能性のある二次構造を形成することができる。高温は二次構造を不安定にするから、熱安定性DNAポリメラーゼでの例えば70-75℃といった高温における延長反応を行なう能力は、このような二次構造を含むDNAの配列決定における著しい改善をもたらす。しかしながら、ポリメラーゼ延長と適合性ある温度が全ての二次構造を除去するわけではない。5'-3'エキソヌクレアーゼ欠損熱安定性DNAポリメラーゼは、この分野におけるさらなる改良である。というのもこのポリメラーゼは、錯型を開裂して不適切な停止すなわち延長

ラシ-オフ・フラグメントをもたらすのではなくむしろ鎖の除去(displacement)反応においてヘパビンを通して合成できるからである。

基本的ジデオキシ(チェーンターミネータ)配列決定に代るものとして、サイクルジデオキシ配列決定は、ジデオキシチェーンターミネータの存在下での鎖的配列の非対称な増幅である。単一のサイクルは考えられる全ての長さの延長生成物の1群を生成する。延長反応生成物をDNA誘型から変性した後、プライマアニーリングとプライマ延長の多くのサイクルがジデオキシチェーンターミネータの存在下で起こる。この方法はPCR法とは異なる。なぜなら、わずか1つのプライマしか用いられず各サイクル内の配列決定反応生成物の増加は直接的であり、増幅生成物は長さが不均一であり、次の反応に対する錯型として設立たないからである。サイクルジデオキシ配列決定は、自動化されたDNA配列決定計器を用いる実験室及びその他の大量配列決定実験室にとって利点を提供する技術である。技術の特異性及び生成されるシグナル量の増大のため、クローニング無しに直接ゲノミックDNAを配列決定することが可能である。サイクル配列決定プロトコルは、ゲノミック、クローニング及びPCR増幅された錯型を含む一本鎖及び二本鎖の錯型に対処する。

熱安定性DNAポリメラーゼは、サイクル配列決定においていくつかの利点をもつ；すなわち、これらのポリメラーゼは、ゲノミック鎖的に対するプライマの特異的ハイブリッド形成のために必要とされるストリンジェント・アニーリング温度に耐え、しかも各サイクル内で起こる高温変性の多くのサイクルに耐える。70-75℃といった高い温度で延長反応を実行することは、二次構造の不安定化のため、二次構造を含むDNAでの配列決定結果における著しい改善をもたらす。しかしながらこのような温度は、全ての二次構造を排除す

るものではない。5'-3'エキソヌクレアーゼ欠損熱安定性DNAポリメラーゼはこの分野におけるさらなる改良である。というのもこのポリメラーゼは、錯型を開裂して不適切な停止を作り出すのではなくむしろ鎖除去(displacement)反応においてヘパビンを通して合成できるからである。さらに、PCRと同様に、サイクル配列決定は生成物の鎖の復元という現象に悩まされる。5'-3'エキソヌクレアーゼ活性を有する熱安定性DNAポリメラーゼの場合、生成物鎖復元によって作られた2本鎖領域へのプライマの延長は、復元された相補的生成物鎖の開裂をもたらす。開裂された鎖はさらに短かいものとなり、かくして不適切な停止として現われる。さらに、適正な予め合成された停止シグナルは減少することになる。5'-3'エキソヌクレアーゼ活性が欠損している熱安定性DNAポリメラーゼは、このような延長生成物フラグメントが形成されないという点で、改良をもたらす。サイクル配列決定の一般形態には、一定の増幅レベルを保持しながら2本鎖錯型の各鎖に対し配列決定梯子を同時に生成することが含まれる(Buana及びIdd, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991年、88:2815-2819)。結合された増幅及び配列というこの方法は、鎖サイクル配列決定と同様の形で5'-3'エキソヌクレアーゼ活性が欠損した熱安定性DNAポリメラーゼの使用からの恩恵をこうむることになる。

特に好ましい態様においては、5'-3'エキソヌクレアーゼ活性が減少されるか又は除去された酵素は、PCRとして知られている核酸増幅反応を触媒し、上述のとおり、その結果、より高い5'-3'エキソヌクレアーゼ活性をもつそれぞれの天然性酵素で達成される以上に優れた望ましい生成物の収量が生み出されることになる。収量の改善は、5'-3'エキソヌクレアーゼ活性によって引き起こされる、すでに合成された生成物を分解する能力が低いことの結

果である。核酸配列を増幅させるためのこの方法は、米国特許第4,683,202号及び4,865,188号の中で開示されそして特許請求されている。これらの記載を引用により本明細書に組み入れる。PCR核酸増幅方法には、核酸又は核酸混合物の中に含まれている少なくとも1つの特定の核酸配列を増幅することが関与し、最も一般的な態様においては、2本鎖DNAが生成される。収量の改善の他に、低下した5'-3'エキソヌクレアーゼ活性をもつ熱安定性DNAポリメラーゼは、より長いPCR生成物を生成する改善された能力、G+Cの豊富な錯型から生成物を生成する改善された能力及びPCR生成物及びDNA配列決定梯子(ladder)を高レベルの2次構造をもつ錯型から生成する改善された能力を示す。

論述する上で容易なように、以下に記すプロトコルでは、増幅すべき特定の配列が2本鎖核酸の中に含まれているということを仮定している。しかしながら、この方法は、ssDNAのごとき1本鎖核酸を増幅する上でも同様に有効である。ただし好ましい実施態様においては、究極的な生成物は2本鎖DNAである。一本鎖核酸の増幅においては、第1の段階には相補的鎖の合成が関与しており(この目的で2つの増幅プライマのうちの1つを用いることができる)、その後続く段階は以下に記す2本鎖増幅法と同じように進められる。

この増幅法は、以下のような段階を含んでいる：

(a) 増幅されるべき各特定の配列について2つのオリゴヌクレオチドプライマ及び4つの異なるヌクレオチド三磷酸と各核酸鎖とを接触させる段階；ここで、各プライマは、特定の配列の異なる鎖に対し実質的に相補的であるよう選択されており、かくして、1つのプライマから合成された延長生成物はその相補体から分離されたとその他のプライマの延長生成物の合成のための錯型として設立することができるようになっていく。この接触作業は、相補的核酸鎖に

対する各プライマのハイブリッド形成を可能にする温度で行なわれる；

(b) 特定の核酸配列の各型に対し相補的なプライマ延長生成物を形成するためスクレオチドリン酸の結合を可能にする本発明の熱安定性DNAポリメラーゼと各核酸型、段階(a)と同時に又はその後で接触させる段階；

(c) 酵素の活性を促進し、増幅中の異なる各配列について各核酸型型に対して相補的な各プライマの延長生成物を合成するために有効な時間にわたりそのために有効な温度において、ただし相補的鎖型から各延長生成物を分離するほど高くはない温度及び時間で、段階

(b)からの混合物を維持する段階；

(d) 一本鎖分子を生成するためプライマ延長生成物が合成された鎖型からこのプライマ延長生成物を分離するのに有効な、ただし酵素を不可逆的に変性するほど高くはない温度及び時間で、段階(c)からの混合物を加熱する段階；

(e) 段階(d)で生成された一本鎖分子の各々に対するプライマのハイブリッド形成を促進するため有効な時間にわたり、そのために有効な温度まで、段階(d)からの混合物を冷却する段階；及び

(f) 酵素の活性を促進し、増幅中の異なる各配列について、段階(d)で生成された各核酸型型に相補的な各プライマの延長生成物を合成するのに有効な時間にわたり、そのために有効な温度で、ただし相補的鎖型から各々の延長生成物を分離するほど高くはない温度及び時間で、段階(e)からの混合物を維持する段階。段階(e)と(f)の有効な時間と温度は一致してよく、かくして段階(e)及び(f)は同時に行なうことができる。段階(d)～(f)は望ましい増幅レベルに至るまで反復される。

酵母、ウイルス、オルガネラ(細胞器)及びさらに高等植物及び動物などの生物体からの天然のDNA又はRNAから得ることができる。DNA又はRNAは、血液、被毛膜細胞などの組織材料又は半膜細胞から、さまざまな技術によって抽出することができる。例えば、Neelatis他、1982年、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) p280～281を参照のこと。従って、この方法は例えば、メッセンジャーRNAを含むDNA又はRNAを利用することができ、これらのDNA又はRNAは、一本鎖であっても二本鎖であってもよい。さらに、各々を1個ずつ含むDNA-RNAハイブリッドを利用することも可能である。これらの核酸のうちのいずれかの混合物は同様に、(同じ又は異なるプライマを用いた)前の増幅反応から生成された核酸と同じように用いることができる。増幅されるべき特定の核酸配列は、大きな分子の単なる一部分であってもよいし或いは又当初から分離された分子として存在し、かくして特定の配列が核酸全体を構成するようになっているともよい。

増幅すべき配列は、当初純粋な形で存在する必要はない。配列は、特定の生物学的試料の極めてわずかな分画しか構成しないであろう特定の微生物による核酸配列の一部分又は、ヒトDNA全体の中含まれたβ-グロブリンの一部分(Saiki他、1985年、Science 230: 1530-1534で例示されているようなもの)といった、複雑な混合物のわずかな分画であってもよい。細胞は、低張緩衝液内での懸濁及び細胞間成分の細胞溶解及び分画が起こるまでの約90℃～100℃での熱処理(一般に1～15分)の後、増幅法において直接用いることができる。加熱段階の後、増幅試薬を直接溶解済み細胞に付加することができる。出発核酸配列は、望ましい一定の核酸配列を複製含むことができる。増幅法は、1つの特定の核酸配列を大量に生産す

増幅方法は、既知の配列の特定の核酸配列を大量に生産するのに有効であるのみならず、存在することはわかっているが完全に特定されていない核酸配列を生産するためにも有効である。1つのプライマから合成された延長生成物が鎖型(相補体)から分離された時点で規定の長さの核酸へのその他のプライマの延長のための鎖型として役立つことができるように配列に続いて相対的な位置に望ましい配列の異なる鎖に対しハイブリッド形成することになる2つのオリゴヌクレオチドポリマーが調製されるように十分に詳しく、充分な数の塩基が配列の両端においてわかっていることだけが必要条件である。配列の両端での塩基についての知識が多ければ多いほど、置換核酸配列に対するプライマの特異性及び反応の特異性及び方法の効率は高いものとなりうる。

いずれの場合でも、増幅すべき配列の初期コピーが利用可能でなくてはならないが、この配列は純粋な又は分離された分子である必要はない。一般に、増幅プロセスには、(a)ハイブリッド形成されることになるオリゴヌクレオチドが合成されるのに充分詳細に所要配列の末端がわかっていること及び(b)連鎖反応を開始するのに少量の配列が利用可能であることを仮定して、関与する反応段階の数との関係において指数的な量で少なくとも1つの特定の核酸配列を生産するための連鎖反応が関与している。連鎖反応の生成物は、使用された特定のプライマの5'末端に相応する末端をもつ分離された核酸の2重鎖となる。

増幅しようとする特定の核酸配列を含んでいるか又は含んでいると思われるものであることを条件として複製された又は複製されていない形のあらゆる核酸配列を出発核酸として利用することが可能である。増幅すべき核酸は、あらゆる供給源例えばpBR322のごときプラスミド、クローニングされたDNAもしくはRNA、又は細菌、酵

るためのみならず、同じ又は異なる核酸分子上にある複製の異なる特定の核酸配列を同時に増幅するためにも役立つ。

PCR法においては、プライマが主要な役割を果たす。増幅法を説明する上で用いられる「プライマ」という語は、特に増幅すべきフラグメントの末端配列に関する情報において幾分かあいまいさがある場合又は1991年8月13日付のPCT出願第91/05-753号内に記されている加重プライマ法を利用する場合において、複数のプライマのことを指すことがある。例えば、タンパク質配列情報から核酸配列が推定される場合、各々の鎖のために、遺伝子コードの暗黙に基づく考えられる全てのコドンの変動を哀れず配列を含むプライマの1つのコレクションを用いることができる。このコレクションの中の1つのプライマは、増幅のために役立つように増幅すべき所望の配列の一部分と充分に相同的なものとなる。

さらに、異なるオリゴヌクレオチドプライマが適切な数用いられるかぎり、最初の核酸又は核酸混合物から複製の特定の核酸配列を増幅することが可能である。例えば、2つの異なる特定の核酸配列を生産しなくてはならない場合、4つのプライマが使用される。プライマのうちの2つは、特定の核酸配列の1つに対して特異的であり、その他の2つのプライマは第2の特定の核酸配列に対して特異的である。この要領で、2つの異なる特定の配列の各々を、当該方法によって指数的に生産することができる。

増幅すべき配列の内部配列(すなわち末端にない配列)に対して相補的な1組のプライマを少なくとも1回の増幅サイクルの後に添加することによって反応においてより大きい特異性を得るため、一定の与えられた数の増幅サイクルの後に、一定の与えられた配列内の1つの配列を増幅することが可能である。このようなプライマは、段階ででも付加することができ、より短い増幅フラグメントを

提供することになる。あるいは、以前に増幅に利用されたプライマと部分のオーバーラップを有しながら非相補的な末端を伴うプライマを用いることにより、さらに長いフラグメントを調製することができる。

プライマは同様に、生体外変異誘発のために増幅法が用いられる場合に主要な役割を果たす。利用されるプライマがもとの鋳型と正確に相補的でない増幅反応の生成物は、鋳型よりもむしろプライマの配列を含むことになり、従って生体外変異を導く。さらなるサイクルにおいて、この変異は、それ以上いかなる誤対合プライミングも必要とされないことから、効率が低減されることなく増幅されることになる。上述のような変異DNA配列を作成する方法は、さらなる配列変異を誘発するべく異なるプライマを用いて変異DNAに対して反復して行なうことができる。このようにして、系列に対して新規に付加する各々のものは、その直前のものとわずかにしか異ならないがもとのDNA原始配列とは断片的に大きく異なる、一連の変異配列を段階的に生み出すことが可能である。

充分な量のプライマが増幅すべき鎖に対して相補的である1つの配列を含んでいることを条件として、プライマはその配列の一部として非相補性配列を含むことができるため、その他の数多くの利点が実現可能である。例えば、プライマの一方又は双方の5'末端において、鋳型配列に対し相補的でないヌクレオチド配列(例えばプロモーター、リンカー、コード配列など)を付着させ、かくしてこれを増幅法の生成物に追加させることが可能である。延長プライマが付加された後、非相補的ヌクレオチドインサートを含む望ましい量の新しい鋳型を達成するため充分なサイクルが行なわれる。こうして、単純な技術を用いて比較的短い時間(例えば2時間以下)内で組合された大量のフラグメントの生産が可能となる。

の量で緩衝液中に存在する。しかしながら、1~20  $\mu$ M という dNTP 濃度が、高い比活性での放射線誘導されたプローブの生成又は DNA 配列決定といったいくつかの利用分野のためには好ましいものであり得る。

標的核酸の核酸鎖は、プライマの延長生成物である追加の核酸鎖の合成のための鋳型として役立つ。この合成は、適切ないかなる方法を用いても行なうことができるが、一般に、好ましくは pH 7~9、最も好ましくは約 8 の pH の緩衝水溶液内で起こる。合成を容易にするため、鋳型鎖を含む緩衝液に対して2つのオリゴヌクレオチドプライマのモル余剰分が加えられる。更なる問題として、付加されるプライマの量は、増幅すべき配列が複雑な長鎖核酸の混合物内に含まれている場合、相補的(鋳型)の量に比べモル過剰状態にある。プロセスの効率を改善するためには、大きいモル過剰が好ましい。従って、1000:1 以上のプライマ対鋳型の比率がクロニングされた DNA 鋳型に対して一般に用いられ、複雑なゲノミック試料からの増幅については一般に約  $10^4$ :1 以上のプライマ対鋳型比率が用いられる。

次に、鋳型、プライマ及びヌクレオシド三磷酸の混合物を、増幅又は検出すべき核酸が2本鎖であるか1本鎖であるかに応じて処理する。核酸が1本鎖である場合、第1の延長サイクルに失立っていかなる変性段階も使用する必要がなく、反応混合物は、プライマの相補的鎖的(鋳型)配列に対するハイブリッド形成を促進する温度に保たれる。このような温度は一般に数秒から5分好ましくは30秒から1分の有効時間にかたり約35℃から65℃以上好ましくは約37℃から60℃である。5'→3'エキソヌクレアーゼ変異体熱安定性 DNA ポリメラーゼのためには、35℃から70℃のハイブリッド形成温度を用いることができる。プライマハイブリッド形成 異性を増大

例えば上述のヌスフォトリエステル及びホスホエステル方法又はその自動化された超標といった何らかの適切な方法を用いて、オリゴヌクレオチドプライマを調製することが可能である。このような自動化された超標の1つにおいては、出発材料としてジエチルホスホロアミジトが用いられ、これは *Science* 誌、1981年、*Tetrahedron Letters* 22: 1859-1862によって記述されているように合成される。修飾された固形支持体上でオリゴヌクレオチドを合成するための1つの方法は、米特許第 4,458,066号に記載されている。同様に、(制限エンドヌクレアーゼ消化物などの)生物学的供給源から分離されたプライマを使用することも可能である。

しかしながら、どんなプライマが使用されようとも、反応混合物は、PCR が起こるよう1つの鋳型を含んでいなくてはならない。というのも、特定の核酸配列はその配列を鋳型として含む核酸を用いることによって生産されるからである。第1の段階には、増幅中の又は検出中の各々の特定の核酸配列について2つのオリゴヌクレオチドプライマ及び4つの異なるヌクレオシド三磷酸と各々の核酸鎖を接触させることが含まれる。増幅又は検出すべき核酸が DNA である場合、ヌクレオシド三磷酸は通常 dATP、dCTP、dGTP 及び dTTP であるが、工程中さまざまなヌクレオチド誘導体も同様に使用可能である。例えば、未知の配列の試料中の既知の配列の検出のために PCR を用いる場合、1991年7月23日付の PCT 出願第 91/05210号(引用によりこの記載を本明細書に組み入れる)に教示されているように、試料の間の汚染を減少させる目的で、dTTP の代りに dUTP がしばしば用いられる。

ヌクレオシド三磷酸の濃度は大幅に変化する。概率的には、濃度は、増幅用緩衝液内で各々の dNTP 中 50~200  $\mu$ M であり、 $\text{MgCl}_2$  はポリメラーゼを活性化させ反応の特異性を増大させるため 1~3 mM

させるためには、長さが15ヌクレオチド以上のプライマが用いられる。これよりも短いプライマには、さらに低いハイブリッド形成温度が必要である。

もとの1本鎖核酸に対する相補体は、適切な緩衝液、dNTPs 及び1又は複数のオリゴヌクレオチドプライマの存在下で本発明の熱安定性 DNA ポリメラーゼを添加することによって合成できる。適切な単一のプライマが付加される場合、プライマ延長生成物は1本鎖核酸に対し相補的なものとなり、(プライマがどこで鋳型とハイブリッド形成するかに応じて)等しい又は等しくない長さの2重鎖に核酸鎖のハイブリッド形成することになり、次にこれは上述のように2つの単一の分離した相補的鎖を生成するべく、一本鎖へと分離される。このとき、もとの一本鎖核酸及び第1のプライマ延長生成物の両方を鋳型として用いて次に続くプライマ延長サイクルが起こるように、第2のプライマが添加される。あるいは、一本鎖核酸に対し2つ以上の適切なプライマ(そのうちの1つは鋳型としてその他のプライマの延長生成物を用いる合成をプライミングする)を添加し、反応を行なわせることができる。

2本鎖標的の増幅又は一本鎖標的の第2サイクルの増幅の場合のように、核酸が2本の鎖を含む場合、核酸の鎖はプライマがハイブリッド形成される前に分離されなくてはならない。この分離は、物理的、化学的又は酵素的手段を含む、適切なあらゆる変性方法によって達成される。核酸の鎖を分離する好ましい物理的方法には、完全な(>99%)変性が起こるまで核酸を加熱することが含まれる。典型的な熱変性には、核酸の組成及びサイズに応じて一般に約数秒から数分までの時間の約80℃~150℃の範囲の温度が関与している。好ましくは、有効な変性温度は数秒から1分の間で80℃~100℃である。ヘリカーゼ活性を有し ATP が存在する中で DNA を変性するも

のであることがわかっている酵素RecA又はヘリカーゼとして知られているクラスの酵素のうちのいずれかの酵素によっても、鎖分断を誘発することが可能である。ヘリカーゼで核酸の鎖を分離するのに適した反応条件は、Eube Hoffmann-Berling, 1978 年 *CSB-Symposium Biology* 43: 63 によって記述されており、RecAを使用するための技術は、Hedding, 1982年, *Ann. Rev. Genetics* 18: 405-437 の中で記述されている。変性は、等しい又は等しくない長さの2つの分離された相補的鎖を生み出す。

2本鎖核酸が熱によって変性される場合、反応混合物は、相補的鎖型(鎖型)配列に対する各プライマのハイブリッド形成を促進する温度まで冷却される。この温度は通常、試薬に応じて約35℃~65℃以上好ましくは37℃~60℃である。ハイブリッド形成温度は一般に数秒から数分、好ましくは10秒から1分までの有効時間中維持される。実際上は、温度は単に約95℃から37℃まで低下せられ、ハイブリッド形成はこの範囲内の温度で起こる。核酸が一本鎖であろうと二本鎖であろうと、本発明の熱安定性DNAポリメラーゼは、変性段階より前又は変性段階中又は温度低下中又は温度がハイブリッド形成を促進するための範囲内にあるときのいずれにでも添加することができる。本発明に基づくポリメラーゼの熱安定性のため、このようなポリメラーゼをいつでも反応混合物に付加することが可能になっているが、混合物がストリンジントハイブリッド形成温度より下に冷却されなくなる時点で反応混合物に対しポリメラーゼを添加することによって非特異的増幅を実質的に抑制することが可能である。ハイブリッド形成の後、反応混合物は次に、酵素の活性が促進されるか又は最適化される温度すなわちハイブリッド形成されたプライマ及び鎖型からのプライマ延長生成物の合成を容易にする上で酵素の活性を増大させるのに十分な温度まで加熱されるか又は

この温度に維持される。温度は実際には、各々の核酸鎖型に対して相補的である各々のプライマの延長生成物を合成するのに十分なものでなくてはならないが、各々の延長生成物をその相補的鎖型から変性するほど高いものであってはならない(すなわち、温度は一般に約80℃~90℃未満である)。

用いられる核酸(1又は複数)に応じて、この合成反応のために有効な標準的な温度は、約40℃~80℃好ましくは50℃~75℃である。さらに好ましい温度は、本発明の熱安定性DNAポリメラーゼについて約65℃~75℃である。この合成に必要な時間は、主として温度、核酸の長さ、酵素及び核酸混合物の複雑性に依りて、約10秒から数分以上であると考えられる。延長時間は通常約30秒から数秒である。核酸がさらに長い場合、より長い時間が相補的鎖合成のために一般に必要とされる。

新たに合成された鎖及び相補体核酸鎖は、増幅プロセスの次に続く段階で用いられる2本鎖分子を形成する。次の段階では、2本鎖分子の鎖は、分子を変性させるのに有効な時間内にわたりこのために有効な温度での熱安定性によって分離されるが、この温度及び時間は、熱安定性酵素が完全にかつ不可逆的に変性されるか又は不活性化されるようなものではない。この鎖型の変性後、温度は、上述のように前段階で製造された相補的一本鎖分子(鎖型)に対するプライマのハイブリッド形成を促進するようなレベルまで低下せられる。

このハイブリッド形成段階の後又はこの段階と同時に、温度は、新たに合成された鎖及びもとの鎖の両方を鎖型として用いたプライマ延長生成物の合成を可能にするため熱安定性酵素の活性を促進するのに有効である温度に調整される。ここでも、温度は上述のように延長生成物をその鎖型から分離(変性)するほど高いものであってはならない。ハイブリッド形成はこの段階で起こる可能性があり、

従って前述の変性後の冷却段階は必要でなくなる。このような場合、同時段階を用いて、好ましい温度範囲は50℃~70℃である。

鎖の分離、ハイブリッド形成及び延長生成物合成の1つのサイクルに關与する加熱及び冷却段階は、特定の核酸配列を望ましい量だけ生成するのに必要とされるだけの回数反復することができる。唯一の制限は、存在するプライマ、熱安定性酵素及びスクレオチド三磷酸の量である。通常15~30サイクルが完全に行なわれる。増幅されたDNAの診断検出を目的とする場合、サイクル数は試料の性質、試料内の初期濃度の濃度及び増幅後に用いられる検出法の感度によって左右される。一定の与えられた検出感度に対しては、増幅中の試料が検出するか初期濃度の濃度が高い場合にはより少ない回数のサイクルしか必要とされない。試料が核酸の複雑な混合物であり初期濃度の濃度が低い場合、検出のために十分にシグナルを増幅するには、さらに多くのサイクルが必要となる。一般的増幅及び検出のためには、この工程が約15回くり返される。標識された配列特異的プローブで検出されるべき配列を生成するのに増幅が用いられる場合及びヒトゲノムDNAが増幅の標的である場合、明らかに検出可能なシグナルが生成されるようなバックグラウンドが検出を妨害することのないように十分に配列を増幅するため工程は15~30回反復される。

いかなる主要試薬も枯渇しておらず又酵素が変性又は不可逆的に不活性化された状態になっていないことを条件として、初期低加の後のいかなる追加のスクレオチド、プライマ又は熱安定性酵素も添加する必要はない。なお上記条件のような場合には、反応が進行するために追加のポリメラーゼ又はその他の試薬を加えなくてはならなくなる。望ましい量 一定の核酸配列を生成するため適切なサイクル数が完了した後、通常の要領すなわちEDTA、フェノール、SOS又

はCICI、を添加して酵素を不活性化することによって吸い又は反応の成分を分離することによって反応を停止することができる。

増幅法は連続的に行なうことができる。自動化された方法の一種様においては、一定の時間中一定のレベルで制御されるべく温度がプログラミングされるような形で反応混合物を温度制御させることができる。この目的をこのような計器の1つとしては、Perkin-Elmer Cetus Instruments により開発され市販されている増幅反応を取り扱うための自動化された機械がある。この計器でPCRを行なうための詳細な指示事項は、計器購入時点で入手可能である。

変更された5'→3'エキソヌクレアーゼ活性をもつ本発明の熱安定性DNAポリメラーゼは、PCRによる核酸配列の増幅が有用であるさまざまなプロセスにおいて非常に役に立つ。増幅方法は、米国特許第4,800,159号に記述されているように適切な表現ベクター内への挿入のため特定の核酸配列をクローニングするのに利用することができる。ベクターは、組換えDNA技術の標準的方法によって配列の遺伝子生成物を生産するべく適切な宿主生体を形質転換するのに使用することができる。このようなクローニングには、平滑末端連結を用いたベクター内への直接連結、又はプライマ内に含まれている部位で開裂するための制限酵素の使用が含まれる。

本発明の熱安定性DNAポリメラーゼに連したその他の方法には、米国特許第4,683,195号及び4,683,202号及び欧州特許公報第229,701号: 237,362号;及び258,017号に記載されているものが含まれる。(これらの記載を引用により本明細書に組み入れる)。さらに、当該酵素は、非特許PCR (Gyllenstein及びBrilich, 1988年, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 7652~7656、(本明細書に引用により組み入れる)を参照のこと); 逆PCR (Ochman他, 1988年, *Genetics* 120: 621 (本明細書に引用により組み入れる)); においても有用

であり、又DNA配列 (Iain 他、1988年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 9436-9440及びMc Conlogue他、1988年、Nucl. Acids Res. 16(20):9869)、cDNA末端のランダム増幅 (RACE)、一連のDNAフラグメントを増幅するに用いられるランダムプライミングPCR、及びNETRQDS: A Companion to Methods in Enzymology (方法: 酵素学方法必携) (1991年) 2: p.11-19でLeh, E. が記述しているようなアンカーPCR及び連結媒介アンカーPCRといった片側特異性 (single-sided specificity) をもつPCR法のためにも有用である。

5'→3'エキソヌクレアーゼ欠損熱安定性DNAポリメラーゼが役に立つもう1つのプロセスは、ポリメラーゼリガーゼ連鎖反応 (PLCR) と呼ばれるプロセスである。その名が示唆しているように、このプロセスは、PCRの特徴とリガーゼ連鎖反応 (LCR) の特徴とを併せもつ。

PLCRの一部には、利用されたdNTPの濃度 (~1 μM) が増幅の程度を制限していた対立遺伝子特異的PCRの特異性を増大させる技術として開発されたものである。PLCRでは、DNAが変性され、4つの相補的ではあるが隣接していないオリゴヌクレオチドプライマがdNTP、熱安定性DNAポリメラーゼ及び熱安定性リガーゼと共に添加される。

プライマは、非調制的に標的DNAにアニーリングし、熱安定性DNAポリメラーゼは非調製プライマの間隙を橋渡ししてプライマを調製させるべく下流プライマの3'末端に対する適切なdNTPの付加をひき起こす。このとき熱安定性リガーゼは2つの隣接するオリゴヌクレオチドプライマを連結することになる。

しかしながら、熱安定性DNAポリメラーゼの中に5'→3'エキソヌクレアーゼ活性が存在することは、このような活性が下流プライマの5'末端からのヌクレオチド又は小さいオリゴヌクレオチド

の切除をひき起こしかくしてプライマの連結を妨げることから、2つのプライマ間隙を閉鎖する確率を著しく低下させる。従って、PLCRにおいては、低下した又は除去された5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を有する熱安定性DNAポリメラーゼが特に有用となる。

簡単に言うと、減少、低下又は除去された5'→3'エキソヌクレアーゼ活性をもつように変異を受けた本発明の熱安定性DNAポリメラーゼは、以下に記述する均質検定技術のような5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を必要とする手順及び技術を除いて、そのそれぞれの変異を受けていないポリメラーゼと同じ手順及び技術のために役立つ。さらに、本発明の変異を受けたDNAポリメラーゼはしばしば、固有の5'→3'エキソヌクレアーゼ活性の減少又は除去に基き、手順及び技術のより効率の良い性能をもたらすことになる。

低下した5'→3'エキソヌクレアーゼ活性をもつ特異的熱安定性DNAポリメラーゼは、Iaa、Iaa、Isp117、I205、Ith、及びIaf DNAポリメラーゼの以下の変異形態を含んでいる。以下の表内及びこの明細書全体を通して、欠失変異は、欠失を構成する番号付けされたヌクレオチド又はアミノ酸を含んでいる。

| DNA<br>ポリメラーゼ | 変異                          | 変異体の呼称               |
|---------------|-----------------------------|----------------------|
| <u>Iaa</u>    | ヌクレオチド配列番号:1内でG(137)からAへ    | pTDA3-2              |
|               | アミノ酸配列番号:2内でGly(46)からAspへ   | ASP 46 <u>Iaa</u>    |
|               | ヌクレオチド配列番号:1のヌクレオチド4-228の欠失 | pTAD2-76             |
|               | アミノ酸配列番号:2のアミノ酸2-76の欠失      | NET-ALA77 <u>Iaa</u> |

|            |                             |  |
|------------|-----------------------------|--|
| <u>Iaa</u> | ヌクレオチド配列番号:1のヌクレオチド4-138の欠失 | pTAD2-46                               |
|            | アミノ酸配列番号:2のアミノ酸2-46の欠失      | NET-PHE47 <u>Iaa</u>                   |
|            | ヌクレオチド配列番号:1のヌクレオチド4-462の欠失 | pTAD2-155                              |
|            | アミノ酸配列番号:2のアミノ酸2-154の欠失     | NET-VAL155 <u>Iaa</u>                  |
|            | ヌクレオチド配列番号:1のヌクレオチド4-606の欠失 | pTAD2-202                              |
|            | アミノ酸配列番号:2のアミノ酸2-202の欠失     | NET-THR203 <u>Iaa</u>                  |
|            | ヌクレオチド配列番号:1のヌクレオチド4-867の欠失 | pL368                                  |
|            | アミノ酸配列番号:2のアミノ酸2-289の欠失     | NET-SER290 <u>Iaa</u> (Stoffel フラグメント) |
|            | ヌクレオチド配列番号:3内でG(110)からAへ    | ASP37 <u>Iaa</u>                       |
|            | アミノ酸配列番号:4内でGly(37)からAspへ   | pTAD2-37                               |
|            | ヌクレオチド配列番号:3のヌクレオチド4-131の欠失 | NET-VAL38 <u>Iaa</u>                   |
|            | アミノ酸配列番号:4のアミノ酸2-37の欠失      | pTAD2-20                               |
|            | ヌクレオチド配列番号:3のヌクレオチド4-60の欠失  | NET-ASP21 <u>Iaa</u>                   |
|            | アミノ酸配列番号:4のアミノ酸2-20の欠失      | pTAD2-73                               |

|             |                             |                          |
|-------------|-----------------------------|--------------------------|
| <u>I205</u> | アミノ酸配列番号:4のアミノ酸1-139の欠失     | NET140 <u>Iaa</u>        |
|             | ヌクレオチド配列番号:3のヌクレオチド4-849の欠失 | pTAD15                   |
|             | アミノ酸配列番号:4のアミノ酸1-283の欠失     | NET284 <u>Iaa</u>        |
|             | ヌクレオチド配列番号:5内でG(128)からAへ    | ASP43 <u>Isp117</u>      |
|             | アミノ酸配列番号:6内でGly(43)からAspへ   | pSPSd2-43                |
|             | ヌクレオチド配列番号:5のヌクレオチド4-129の欠失 | NET-PHE44 <u>Isp117</u>  |
|             | アミノ酸配列番号:6のアミノ酸2-43の欠失      | pSPSd2-73                |
|             | ヌクレオチド配列番号:5のヌクレオチド4-219の欠失 | NET-ALAT4 <u>Isp117</u>  |
|             | アミノ酸配列番号:6のアミノ酸2-73の欠失      | pSPSd2-151               |
|             | ヌクレオチド配列番号:5のヌクレオチド4-453の欠失 | NET-LEU152 <u>Isp117</u> |
|             | アミノ酸配列番号:6のアミノ酸2-151の欠失     | pSPSd2-199               |
|             | ヌクレオチド配列番号:5のヌクレオチド4-597の欠失 | NET-THR200 <u>Isp117</u> |
|             | アミノ酸配列番号:6のアミノ酸2-199の欠失     | pSPSd288                 |
|             | ヌクレオチド配列番号:5のヌクレオチド4-861の欠失 | NET-ALA288 <u>Isp117</u> |

|             |                          |                   |
|-------------|--------------------------|-------------------|
| <u>I205</u> | アミノ酸配列番号:6のアミノ酸2-207の欠失  | ASP46 <u>I205</u> |
|             | ヌクレオチド配列番号:7内でG(127)からAへ | pZOSd2-46         |

11h

|                                 |                    |
|---------------------------------|--------------------|
| アミノ酸配列番号:8の<br>アミノ酸2-46の欠失      | NET-PHE47<br>1205  |
| スクレオチド配列番号:7の<br>スクレオチド4-231の欠失 | pZ05d2-77          |
| アミノ酸配列番号:8の<br>アミノ酸2-77の欠失      | NET-ALA78<br>1205  |
| スクレオチド配列番号:7の<br>スクレオチド4-475の欠失 | pZ05d2-155         |
| アミノ酸配列番号:8の<br>アミノ酸2-135の欠失     | NET-VAL156<br>1205 |
| スクレオチド配列番号:7の<br>スクレオチド4-609の欠失 | pZ05d2-203         |
| アミノ酸配列番号:8の<br>アミノ酸2-203の欠失     | NET-THR204<br>1205 |
| スクレオチド配列番号:7の<br>スクレオチド4-813の欠失 | pZ05A292           |
| アミノ酸配列番号:8の<br>アミノ酸2-291の欠失     | NET-ALA292<br>1205 |
| スクレオチド配列番号:9内<br>で6(127)からA     | ASP45 11h          |
| スクレオチド配列番号:9の<br>スクレオチド4-138の欠失 | pTTHd2-46          |
| アミノ酸配列番号:10の<br>アミノ酸2-46の欠失     | NET-PHE47<br>11h   |
| スクレオチド配列番号:9の<br>スクレオチド4-231の欠失 | pTTHd2-77          |
| アミノ酸配列番号:10の<br>アミノ酸2-77の欠失     | NET-ALA78<br>11h   |
| スクレオチド配列番号:9の<br>スクレオチド4-465の欠失 | pTTHd2-155         |
| アミノ酸配列番号:10の<br>アミノ酸2-155の欠失    | NET-VAL156<br>11h  |
| スクレオチド配列番号:9の<br>スクレオチド4-609の欠失 | pTTHd2-203         |

1a1

|  |                   |
|--|-------------------|
| アミノ酸配列番号:10の<br>アミノ酸2-203の欠失             | NET-THR204<br>11h |
| スクレオチド配列番号:9の<br>スクレオチド4-873の欠失          | pTTHA292          |
| アミノ酸配列番号:10の<br>アミノ酸2-281の欠失             | NET-ALA292<br>11h |
| スクレオチド配列番号:11内で<br>6(110)からA、及び6(111)からT |                   |
| アミノ酸配列番号:12内<br>でGly(37)からAsp.           | ASP37 1a1         |
| スクレオチド配列番号:11の<br>スクレオチド4-111の欠失         | pTAPd2-37         |
| アミノ酸配列番号:12の<br>アミノ酸2-37の欠失              | NET-L8038<br>1a1  |
| スクレオチド配列番号:11の<br>スクレオチド4-219の欠失         | pTAP09            |
| アミノ酸配列番号:12の<br>アミノ酸2-93の欠失              | NET-TYR94<br>1a1  |
| スクレオチド配列番号:11の<br>スクレオチド4-417の欠失         | pTAF11            |
| アミノ酸配列番号:12の<br>アミノ酸2-139の欠失             | NET-GLU140<br>1a1 |
| スクレオチド配列番号:11の<br>スクレオチド4-609の欠失         | pTAPd2-203        |
| アミノ酸配列番号:12の<br>アミノ酸2-203の欠失             | NET-THR204<br>1a1 |
| スクレオチド配列番号:11の<br>スクレオチド4-852の欠失         | pTAF1285          |
| アミノ酸配列番号:12の<br>アミノ酸2-284の欠失             | NET-ILE285<br>1a1 |

強化された5'→3'エキソヌクレアーゼ活性をもつ熱安定性  
DNAポリメラーゼ

本発明のもう1つの態様は、それぞれの天然ポリメラーゼのもの  
に比べて強化された又は増大された5'→3'エキソヌクレアーゼ  
活性を示す熱安定性DNAポリメラーゼの生成を含む。増加された又

は強化された5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を有する本発明の  
熱安定性DNAポリメラーゼは、1991年8月6日付のPCR出願第91/0  
5571号内に記されている均質(homogeneous)検定系において特に有  
用である(引用により本明細書に組み入れる)。簡単に言うと、こ  
の系は、以下の段階を含む、試料中の標的アミノ酸配列の検出方法  
である:

(a) 標的核酸の領域に対して相補的な1つの配列を含むオリゴ  
ヌクレオチド及び同じ標的核酸領域の第2の領域に対し相補的な1つ  
の配列を含むが第1のオリゴヌクレオチドが規定する核酸配列を含  
まない標識されたオリゴヌクレオチドと、一本鎖核酸を含む試料と  
を接触させて、ハイブリッド形成条件下で2重鎖の混合物を生成す  
る段階; なお、ここでこれらの2重鎖は、第1のオリゴヌクレオチ  
ドの3'末端が標識されたオリゴヌクレオチドの5'末端に隣接す  
るように第1のオリゴヌクレオチド及び標識されたオリゴヌクレオ  
チドにアニーリングされた標的核酸を含んでいる;

(b) ポリメラーゼの5'→3'ヌクレアーゼ活性が、アニーリン  
グされ、標識されたオリゴヌクレオチドを隣接した標識されたフラグ  
メントを解放できるようにするのに充分な条件の下に、5'→3'  
ヌクレアーゼ活性をもつ標識依存型核酸ポリメラーゼと共に段階

(c) の混合物を維持する段階; 及び

(d) 標識されたフラグメントの放出を検出し及び/又は測定する  
段階。

この均質検定系は、標的配列が増幅されている間にシグナルを生  
成し、かくしてその他の検定システムに共通の増幅された生成物の  
増幅後の取り扱いを最低限におさえるものである。さらに、増大し  
た5'→3'エキソヌクレアーゼ活性をもつ熱安定性DNAポリメ  
ラーゼの好ましい用途は、PCR技術を利用する均質検定系におい

てである。この特定の検定系には、以下の段階が関与している:す  
なわち、

(a) 前記試料を含むPCR検定に、標的核酸の領域に対し相補的な  
配列を含む少なくとも1つの標識オリゴヌクレオチドを提供する段  
階; なおここでこの標識オリゴヌクレオチドは段階(b)のオリゴ  
ヌクレオチドプライマによって境界づけられた標的核酸配列内でア  
ニーリングする;

(b) 一組のオリゴヌクレオチドプライマを提供する段階、なおこ  
で第1のプライマは、標的核酸配列の1つの領域の中の1領域に対  
し相補的な配列を含み、相補的DNA鎖の合成を起動させ、又第2の  
プライマは、標的核酸の第2の領域の1領域に対し相補的な配列を  
含み、相補的DNA鎖の合成を起動させる; 又ここで各オリゴヌクレ  
オチドプライマは、同じ核酸領域にアニーリングされたあらゆる標識  
オリゴヌクレオチドの上流でその相補的標識にアニーリングするよ  
うに選択されている;

(c) (1) 標的領域内に含まれている標識核酸配列へのプライマ  
及び標識オリゴヌクレオチドのアニーリング及び(11)プライマの  
延長というPCR循環段階を許容する条件下で標識依存性重合剤とし  
て5'→3'ヌクレアーゼ活性をもつ核酸ポリメラーゼを利用して  
標的核酸配列を増幅する段階; なおここで、この核酸ポリメラーゼ  
は、核酸ポリメラーゼの5'→3'ヌクレアーゼ活性が標識オリゴ  
ヌクレオチドとその相補的標識核酸配列を含むアニーリングされた  
2重鎖から同時に標識フラグメントを放出して検出可能なフラグメ  
ント生成する間に、1つのプライマ延長生成物を合成する;

及び

(d) 試料中の標的配列の存在又は不在を見極めるため標識フラグ  
メントの放出を検出し及び/又は測定する段階。

本発明に基づく熱安定性DNAポリメラーゼの増大した5'-3'エキソヌクレアーゼ活性は、均質検定系内で用いられた場合、その大きい方の相補的オリゴヌクレオチドにアニーリングされたオリゴヌクレオチドからのモノヌクレオチド又は小さいオリゴヌクレオチドの脱離をひき起こす。脱離が効率良く起こるためには、上流オリゴヌクレオチドも同様に、同じ大きい方のオリゴヌクレオチドにアニーリングされなくてはならない。

この上流オリゴヌクレオチドの3'末端は、核酸ポリメラーゼのための初期結合部位を提供する。結合されたポリメラーゼが下流オリゴヌクレオチドの5'末端に遭遇すると直ちにポリメラーゼは、モノヌクレオチド又は小さいオリゴヌクレオチドをそれから脱離させることができる。

2つのオリゴヌクレオチドは、それらが相補的標的核酸上で近くでアニーリングして上流オリゴヌクレオチドの3'末端に対する核酸ポリメラーゼの結合がそれを自動的に下流オリゴヌクレオチドの5'末端と接触状態に置くことになるように設計される。この方法は、脱離を促進するべく核酸ポリメラーゼを所定の位置にもってくるのに重合が必要とされないことから、「重合非依存性脱離」と呼ばれる。

あるいは、2つのオリゴヌクレオチドが解型核酸標的のより遠く隔離された領域にアニールする場合、核酸ポリメラーゼが下流オリゴヌクレオチドの5'末端と遭遇する前に重合が起こらなくてはならない。重合が進行するにつれて、ポリメラーゼは下流オリゴヌクレオチドの5'末端からモノヌクレオチド又は小さいオリゴヌクレオチドを徐々に脱離させる。この脱離は、下流オリゴヌクレオチドの強りが、解型分子から解離する程度にまで不安定化されてしまうまで続く。この工程は「重合依存性脱離」と呼ばれる。

でその他のプライマの延長のための誘型として役立ちかくして規定の長さの複製型を生成するように選択される。

相補的鎖はプローブ又はプライマのいずれよりも長いことから、鎖はより多くの接触点をもち、従って与えられたいかなる時間になっても互いを見出す確率がさらに高くなっている。高いモル余剰のプローブ、及びプライマは、誘型の再アニーリングよりもむしろプライマ及びプローブのアニーリングの方へ平衡を傾かせる一助となる。

プライマは、重合剤が存在する中で延長生成物の合成を起動するのに充分な長さをもっていないなくてはならない。プライマの正確な長さ及び組成は、アニーリング反応の温度、プライマの供給源及び組成、プライマアニーリング部位までのプローブアニーリング部位の近接性及びプライマ対プローブ濃度の比率を含む数多くの要因によって左右される。例えば、標的配列の複雑性に依りて、オリゴヌクレオチドプライマは標的に約15〜30個のヌクレオチドを含んでいるが、1つのプライマがそれ以上又はそれ以下のヌクレオチドを含むこともできる。プライマはそのそれぞれの鎖に選択的にアニーリングし、安定した2重鎖を形成するだけの充分な相補性を有してなくてはならない。

ここで用いられるプライマは、増幅すべき各特定の配列の異なる鎖に対して「実質的に」相補的となるように選択される。プライマは、誘型の正確な配列を反映している必要はないが、そのそれぞれの鎖に選択的にハイブリッド形成するのに充分な相補性を有してなくてはならない。非相補的鎖又はより長い配列をプライマの中に点在させたり又はプライマの末端部に位置づけることも可能であるが、この場合、プライマが誘型鎖と安定した2重鎖を形成するのに充分な相補性をこの誘型鎖との間に保持していることを条件とす

下流オリゴヌクレオチドに対する標的の取りつけが、開裂されたモノヌクレオチド及び小さいオリゴヌクレオチドの検出を可能にする。その後は、未開裂の標的オリゴヌクレオチドをその開裂されたフラグメントから区別するため、標的の方法のうちのいずれでも利用できる。この要領で、上流及び下流のオリゴヌクレオチドに対して相補的な配列を含む核酸試料を調製することが可能である。換言すると、PCRの開始時点でプライマに付随して標的オリゴヌクレオチドが添加され、プローブの標的ヌクレオチドの加水分解から生成されたシグナルが標的配列の増幅中の検出のための手段を提供する。

均質検定系の方法においては、問題の特定のオリゴヌクレオチド配列すなわち「標的核酸」を含んでいる疑いのある試料が提供される。試料中に含まれている標的核酸はまず必要とあらばcDNAに逆転写され、次に、当業者にとっては周知の物理的、化学的又は酵素的手段を含む適当なるあらゆる変性方法を用いて変性せられる。標的核酸のための好ましい物理的手段には、完全に(>99%)変性されるまで核酸を加熱することが含まれる。代表的な変性には、数秒から数分に至るまでの時間、約80℃から約105℃までの温度が関与する。変性に対する1つの代替法として、標的核酸は、例えば一本鎖RNA又はDNAウイルスといったように試料中に一本鎖形態で存在する可能性がある。

この場合、変性された核酸鎖は、単一の核酸鎖へのプライマ及びプローブの結合を可能にする条件であるハイブリッド形成条件下で、予め選択されたオリゴヌクレオチドプライマ及び標的オリゴヌクレオチド(ここでは、「プローブ」としても言及されている)と共に保温される。当該技術分野において良く知られているように、プライマは、その2重鎖配列に合った相対的位置が、1つのプライマから合成された延長生成物がその誘型(相補体)から分離された時点

る。プライマの非相補性ヌクレオチド配列は制限酵素部位を含んでもよい。

均質検定系の実現に際しては、標的オリゴヌクレオチドはまず最初に、核酸ポリメラーゼがこの2重鎖領域に遭遇する前に相補的核酸にアニーリングされ、かくして5'-3'エキソヌクレアーゼ活性が標的オリゴヌクレオチドフラグメントを開裂及び放出するのを可能にしなくてはならない。

プライマ延長重合がこの2重鎖領域に達する前に又はポリメラーゼが重合非依存性工程において上流オリゴヌクレオチドに付着する前に標的オリゴヌクレオチドが相補的核酸にアニーリングしてしまっている確率を高めるためには、さまざまな技術を利用することができる。重合非依存性工程については、プローブの5'末端がプライマの3'末端から比較的遠くなりかくしてプローブにはプライマ延長がプローブ結合部位をブロックする前にアニールするためのより多くの時間が与えられることになるように、プローブを位置づけることができる。短かいプライマ分子は一般に、標的核酸と充分に安定したハイブリッド複合体を形成するのに比較的低い温度しか必要としない。従って、標的オリゴヌクレオチドがプライマアニーリングとの関係において比較的高い温度で標的に優先的にアニーリングするように、標的オリゴヌクレオチドをプライマよりも長くするように設計することが可能である。

異なる熱安定性をもつプライマ及び標的オリゴヌクレオチドを使用することも可能である。例えば、プライマよりも大きいG/C含有量ひいてはプライマよりも大きい熱安定性をもつように、標的オリゴヌクレオチドのヌクレオチド組成を選択することが可能である。同様のやり方で、天然の核酸の中に典型的に存在する塩基よりもさらに安定した塩基対を形成する塩基類似体を含む変性されたヌクレ

オリゴヌクレオチドをプローブの中に取り入れることが可能である。

当該検定の効率を最大限にするためプライマ結合に先立ってプローブ結合を容易にすることのできるプローブの変更としては、プローブと標的のポリアニオンバックボーンの相反を減少させるためのプローブ内への正に帯電した又は中立のホスフォジエステル連鎖の取込み、(Letisager 他、1988年、*J. Amer. Chem. Soc.* 110: 4470を参照)；塩基の積み重ね (stacking) を増大させるための、

プローブ内への5'-プロモウリジンのごときアルキル化又はハロゲン化された塩基の取込み；増大した塩基の積み重ねをもつ「A」構造へとプローブ封鎖的の2重鎖を強制するための、プローブ内へのリボヌクレオチドの取込み；及びプローブ内でのアデノシンの一部分又は全てに対する、6-ジアミノプリン(アミノアデノシン)の置換が含まれる。本発明に基づくこのような変更されたプローブを調整するにあたっては、2重鎖形成の律速段階が「核形成」つまり単一の塩基対の形成であり、従って望まれる結果を達成するためには例えば3'又は5'末端部分のみといったようにプローブの一部分の生物物理学的特性を変えるだけで充分であるということを確認すべきである。さらに、プローブの3'末端部分(3'末端の8〜12ヌクレオチド)がポリメラーゼによる5'末端のエキソスクレアーゼ分解の後で解離することから、3'末端の変更はポリメラーゼ/ヌクレアーゼ活性との干渉に関わり無く、行なうことができる。

標的オリゴヌクレオチド及びプライマの異なる熱安定性を利用するべく、熱循環パラメータも同様に調整させることができる。例えば、熱循環における変性段階に於いて、標的オリゴヌクレオチドの結合には許容されるがプライマ結合には許容されない中間温度を導入することが可能であり、この場合、温度はプライマのアニーリング及び延長を可能にすべくさらに低下させられる。しかしながら通

常な結果を得るためには、後のPCR法のサイクルにおいてのみプローブ開裂が起こる必要があるという点に留意されたい。従って、後のサイクルにおいてプローブが優先的にプライマに結合しようとした場合プライマが当初優先的にプローブに結合しようともプライマ濃度がプライマ延長を通して減少されるような形で、反応混合物を設定することが可能である。

プライマの前に標的オリゴヌクレオチドの結合に有利に作用するためには、プライマ温度に対する標的オリゴヌクレオチドの高いモル濃度も使用することができる。この態様においては、標的オリゴヌクレオチド濃度は、典型的に、一般に $0.5 \sim 5 \times 10^{-4} M$ であるそれぞれのプライマ濃度よりも約2〜20倍高い範囲内にある。当業者であれば、オリゴヌクレオチド濃度、長さ及び塩基組成が各々、反応混合物内のいずれかの特定のオリゴヌクレオチドの $T_m$ に影響を及ぼす重要な要因であることを認識することができる。これらの要因の各々は、プライマアニーリングよりもプローブアニーリングに有利に作用するため熱力学的偏りを作り出すように操作されうるものである。

当然のことながら、増幅が関与しない系に対して、均質検定システムを適用することもできる。実際、本発明は、重合が起こることを必要とさえしていない。重合非依存性の系のもつ1つの利点は、標的配列の増幅の必要性を無くするという点にある。プライマ延長が存在しない場合、標的塩基は本質的に一本鎖である。プライマ及び標的オリゴヌクレオチドが標的塩基に対し隣接して結合されていることを条件として、オリゴヌクレオチドのアニーリングと標的フラグメントの開裂の逐次的ラウンドが起こりうる。従って充分量の標的フラグメントを生成することができ、かくして重合が無い状態での検出が可能となる。当業者であればわかるように、PCR増幅

中に生成されたシグナルはこの重合非依存性活性により増大される。

上述の均質検定系に加えて、強化された5'→3'エキソヌクレアーゼ活性をもつ本発明の熱安定性DNAポリメラーゼは同様に、PCRプライマの1つが標的配列のRNAコピーを複製するのに用いられるプロモータをコードするような転写増幅系のごときその他の増幅系においても有用である。同様に、本発明は、全て単一の温度でその熱DNAコピーを複製するのに使用されることになるRNA転写物を作るのにさまざまな酵素を用いる自己保持配列複製(3SR)系においても使用することができる。5'→3'エキソヌクレアーゼ活性をもつポリメラーゼを適切なオリゴヌクレオチドと共にリガーゼ連鎖反応(LCR)システム内に取込むことにより、LCR生成物を検出するのに本発明を利用することもできる。

同様に、5'→3'エキソヌクレアーゼ欠損熱安定性DNAポリメラーゼがPLCRにおいて役立つのと同じ様に、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性をもつその他の熱安定性DNAポリメラーゼも異なる状況下でPLCRにおいて役に立つ。このことは、PLCRにおける下流プライマの5'末端が標的DNAに対して非相補的である場合にいえることである。このような非相補性は、上流プライマの5'末端が通常のDNAにアニーリングすることになるフォーク状構造をひき起こす。

熱安定性リガーゼはこのようなフォーク状構造に対して作用できない。しかしながら、熱安定性DNAポリメラーゼ内の5'→3'エキソヌクレアーゼ活性の存在は上流プライマのフォーク状5'末端の切除をひき起こし、かくしてリガーゼが作用できるようにする。

低下した5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を有する熱安定性DNAポリメラーゼを調整するのに効果的であるものとして以上に記述さ

れている同じプロセス及び技術は、強化された5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を有する熱安定性DNAポリメラーゼを調整するためにも同様に有効である。上述のように、これらの方法は、部位特異的変異検出、欠失変異検出及び「ドメイン・シャフリング」といった技術も含んでいる。

強化された5'→3'エキソヌクレアーゼ活性をもつ熱安定性DNAポリメラーゼを調整する上で特に有用なのは、上述の「ドメイン・シャフリング」技法である。簡単に要約すると、この技術には、そのポリメラーゼの非常に活発な5'→3'エキソヌクレアーゼ活性をコードするものとして認められているポリメラーゼの特定のドメインの開裂及びその後このドメインをさらに低いレベル又はゼロレベルの5'→3'エキソヌクレアーゼ活性をコードする第2の熱安定性DNAポリメラーゼ遺伝子の適切な領域内へと移送することが含まれる。望まれるドメインは、第2の熱安定性DNAポリメラーゼの望ましくない特性をコードするドメインに置き換えることができ、又第2の熱安定性DNAポリメラーゼのヌクレオチド配列に付加することもできる。

約291〜484のコードンを含む $I_{\text{tag}}$  DNAポリメラーゼコード配列が $I_{\text{tag}}$  DNAポリメラーゼエコドン289〜422の代りに使用されている特定の「ドメインシャフリング」例が上に記されている。この置換は、 $I_{\text{tag}}$  DNAポリメラーゼの5'→3'エキソヌクレアーゼドメイン(コードン1〜289)、 $I_{\text{tag}}$  DNAポリメラーゼ3'→5'エキソヌクレアーゼドメイン(コードン291〜484)及び $I_{\text{tag}}$  DNAポリメラーゼのDNAポリメラーゼドメイン(コードン423〜832)を含む新規な熱安定性DNAポリメラーゼを生み出す。しかしながら、当業者であれば、強化された5'→3'エキソヌクレアーゼ活性のごときいくつか望まれる特徴をもつ熱安定性DNAポリメラーゼを構築するためにそ

の他の置換も行なうことができるということが認識できることだろう。

以下の例は、例示を目的としてのみ提供されているものであり、請求されている発明の範囲を制限する意図は全く無いものである。これらの例において、全ての百分率は、相反する規定のない限り、固体の場合重量百分率であり、液体の場合体積百分率であり、全ての温度は摂氏温度で示されている。

### 例1

#### 既知の5'→3'エキソヌクレアーゼドメインの断片を突然変異PCR 誘発によるTag DNAポリメラーゼの5'→3'エキソヌクレアーゼ突然変異体の調製

##### インサートの調製

PCRのための誘型としてプラスミドpLSC12を用いた。このプラスミドは、配列番号：1のTagポリメラーゼ遺伝子ヌクレオチド616～621がAAGCTTからAAGCTGに換えられたpLSC5のHindIIIマイナスヴァージョンである。この変化により、コードされるタンパク質配列を変更することなくTagポリメラーゼ遺伝子内でHindIII認識配列が削除された。

プライマとしてオリゴヌクレオチドH161(AGGACTACAGCTGGCAGACACC)(配列番号：21)及びH161(CGAGGCGCGCCAGCCCGAGAGATCTACGAGCTCCITG)(配列番号：22)を用い誘型としてpLSC12を用いて、Tagポリメラーゼ遺伝子のATG出発(コドン)を含む384bpフラグメントならびにATG出発コドンの下流のコード配列の追加の331bpを増幅するため、PCRを行なった。

以下の製剤及び反応物を以下の量だけ用いて、100μLのPCRを25サイクルにわたり行なった：

プライマH161(配列番号：21) 50pmol；  
プライマH161(配列番号：22) 50pmol；  
各dNTP50μM；  
トリス-HCl, pH8.3, 10mM；  
KCl 50mM；  
MgCl<sub>2</sub> 1.5mM；  
pLSC12, 15.6pg；  
AmpliTaq DNAポリメラーゼ 2.5単位。

上述のPCR反応混合物をPerkin-Elmer Cetusサーモサイクラー内に入れ、以下のプロフィールを通して作用させた。まず反応混合物を1分45秒にわたり最高98℃まで上昇させ、25秒間98℃で保持した。反応混合物を次に45秒にわたり55℃まで下降させ、20秒間この温度に保った。最後に混合物を45秒にわたり最高72℃まで上昇させ、30秒間72℃に保った。最後の5分の延長は、75℃にて起こった。

次にPCR生成物をクロロホルムで抽出し、当該技術分野においては周知の技術を用いてイソプロパノールで析出させた。

2時間37℃で、300ngのPCR生成物試料を20UのHindIIIで消化した(30μLの反応中)。この一連の消化は、クローニングのための330bpのフラグメントを生み出した。

37℃で2時間20UのHindIII(40μL中)で5.3μLのpLSC12を消化することによって、ベクターを調製した。この消化の後で続けて12UのHindIIIを追加し、50℃で2時間保温した。

30℃で30分間CIAP(子牛の腸内アルカリ性ホスファターゼ)特に0.04UのCIAPで処理することにより、ベクターを脱リン酸した。次に反応を停止させるためベクター調製物に対して500mMのEGTAを4μL添加し、45分間65℃で保温することによりホスファターゼを不活性化させた。

上述のホスファターゼ処理されたベクター225ngを10ngのPCR誘導されたインサートと1：1のモル比で連結した。

次に、DG116細胞を連結混合物の5分の1で形質転換し、30℃でアンピシリン耐性形質転換体を選択した。0.0...0.7に至るまで30℃で一晩適切なコロニーを増殖させた。PLベクターを含む細胞を37℃で4時間、9時間又は20時間、振とう水浴内で保温し、調製物を音波処理し、0.2Mの硫酸アンモニウムが存在する中で75℃で熱処理した。最後に、ポリメラーゼ活性及び5'→3'エキソヌクレアーゼ活性について抽出物を検定した。

上述の5'→3'エキソヌクレアーゼ検定を利用して5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を数量化した。具体的に言うと、ガンマー(<sup>32</sup>P)ATP(3000C：1μmol)及びT4ポリヌクレオチドキナーゼを用いて5'末端において、合成3'リン酸化オリゴヌクレオチドプローブ(ポリメラーゼ延長を排除するためリン酸化されたもの)BHS3(GATCGCTGGCGTAACACACACCCGCCGCGCP)(配列番号：13)(100pmol)を<sup>32</sup>P標識した。反応混合物をフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコールで抽出しその後続けてエタノール沈殿させた。<sup>32</sup>P標識したオリゴヌクレオチドプローブを100μLのTE緩衝液内に再溶解させ、Sephadex G-50 スピニングカラム上でのゲルろ過クロマトグラフィーにより、取込まれなかったATPを除去した。10mMのトリス-HCl(pH8.3)、50mMのKCl、及び3mMのMgCl<sub>2</sub>を含む100μLの反応において5pmolの合成オリゴヌクレオチドプライマBHS3(GCGCTAGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCA)(配列番号：14)の存在下で、5pmolの32p標識されたBHS3プローブを、5pmolの一本鎖HISep10W DNAにアニーリングさせた。アニーリング混合を5分間95℃まで加熱し、10分にわたり70℃まで冷却し、さらに10分間70℃で保温し、次に30分にわたりPerkin-Elmer Cetus DNAサーマルサイクラーの中で25

℃になるまで冷却した。10μLのアニーリング混合物を含むエキソヌクレアーゼ反応物を1分間70℃で予備保温した。予備保温反応物に対し2.5μLの体積で本発明の熱安定性DNAポリメラーゼ調製物(約0.3Uの酵素活性)を加え、反応混合物を70℃で保温した。1分後と5分後にアリコート(5μL)を取り出し、60mMのEDTAを1μL付加することによって停止させた。反応生成物をホモクロマトグラフィーによって分析し、エキソヌクレアーゼ活性をオートラジオグラフィーに従って数量化した。Polygram CEL3000BAEセルロース厚層クロマトグラフィー板上で7Mの尿素内に2%の一部分加水分解された酵母RNAを含むホモクロマトグラフィー混合液の中でクロマトグラフィーを行なった。5'→3'エキソヌクレアーゼ活性の存在は小さい<sup>32</sup>P標識されたオリゴマの生成をひき起こし、このオリゴマはTLC板を上へと移動し、原点に残った分解していないプローブからオートラジオグラム上で容易に区別された。

クローン3-2は、予想されたレベルのポリメラーゼ活性を有していたが、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性はほとんど検出不能であった。これは、天然Tag DNAポリメラーゼの中に存在するものに比べ、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性について1000分の1以上の減少に相当した。

このクローンを次に配列決定し、G(137)がDNA配列内でAに置き換えていることがわかった。この変異は、Tag DNAポリメラーゼのA3ノ酸配列においてGly(46)からAspへの置き換をひき起こし、かくして著しく低下した5'→3'エキソヌクレアーゼ活性をもつ本発明の熱安定性DNAポリメラーゼをもたらした。

回収されたタンパク質は、1990年5月15日付出願の米国特許出願第529,394号(引用により本明細書に組み入れる)の中で教示されているTag DNAポリメラーゼプロトコールに従って純化させた。

## 例2

## TaqポリメラーゼのNes789 (A289)544 アミノ酸形成の構成

1990年5月15日に提出された米国特許第523,394号の例9に示されているように、天然Taqポリメラーゼの精製中に、70℃でdNTPの錯型依存型組込みを促進する変異形態のTaqポリメラーゼが得られた。この変異形態のTaqポリメラーゼは、免疫学的に言うと、精製された天然Taqポリメラーゼのおよそ90kdの形態と関係あるものであったが、分子量はそれよりも低いものであった。SDS-PAGE電気泳動に従ったBSA及びオバルブミンとの関係における移動度に基づくと、この形態の見かけの分子量は約61kdである。酵素のこの変異形態は、SDS-PAGEウェスタンブロット分析法或いは又SDS-PAGEゲル電気泳動法に従った原位置DNAポリメラーゼ活性測定 (Spanos, A., 及びHubscher, O. (1983年) *Math. Biosci.* 91: 263-277) によって決定されるように*Thermus aquaticus* 細胞のろ液に調製された粗抽出液の中には存在しない。この形態は、試料の取り扱いの間に生じるタンパク質分解の人工産物であると思われる。この比較的低い分子量の形態は、均質になるまで精製され、ABI自動相シークンチング上でN末端配列決定が行われた。得られたN末端配列をTaqポリメラーゼ遺伝子から予想されるアミノ酸配列 (配列番号: 1) と比較すると、この比較的短い形態がGlu (289) とSer (290) の間のタンパク質分解による開裂の結果として生じたものであることがわかる。

544 アミノ酸の合成を誘導するTaqポリメラーゼ遺伝子のさら末端が切断された形態を得るためには、一次翻訳産生プラスミド pFC54-1、pSYC1578及び相補的合成オリゴヌクレオチド DG29 (5'-AGCTTATGCTCTCCAAAAGCT) (配列番号: 23) 及び DG30 (5'-ACCTTTTGGACACATA) (配列番号: 24) を用いた。Hind III及びBam HI

を用いてプラスミド pFC54-1 の完全消化を行った。プラスミド pSYC1578をHind IIIで消化し (配列番号: 1 のヌクレオチド 872-883 において)、4種類のdNTPの全て存在下で大腸菌 (*E. coli*) DNAポリメラーゼIIを用いたフラグメントで処理することによりヌクレオチド3'末端末端を除去し、そしてTaqポリメラーゼ配列内にLeu294をコードするCIG末端の2重鎖末端を生成せしめた (Taqポリメラーゼ配列番号: 1ヌクレオチド880-882を参照)。DNA試料をHind IIIを用いて完全消化を行い、アガロースゲル電気泳動法と電気泳出法によっておよそ1.6kbのHind III (修復されたもの)/Hind III Taq DNAフラグメントを精製した。pFC54-1 プラスミド消化物 (0.1µmol) をTaqポリメラーゼ遺伝子フラグメント (0.3µmol) 及びアニーリングされた非リン酸化DG29/DG30 2重鎖アダプタ (0.5µmol) と30µg/ml、15℃で一晩、粘着性リガーゼ条件の下で連結した。DNAを1.0mlあたり約10マイクログラムまで希釈させ、平衡末端条件下で連結を続行した。連結されたDNA試料をHind IIIで消化し、あらゆるHind III-2ミューテインコード連結生成物を滅菌状態 (不活性化) した。大腸菌 (*E. coli*) K12菌株DG116をアンピシリン耐性へと形質転換するため、80ナノグラムの連結され消化されたDNAを使用した。EcoRI (4,781bp+2,385bp), PstI (4,138bp+3,029bp), SmaI (7,167bp) 及びHind III/PstI (3,400bp+3,029bp+738bp) で予想された消化生成物を生成するおよそ7.17kbのプラスミドの存在について、Amp<sup>r</sup> 候補をスクリーニングした。候補プラスミドを宿主大腸菌 (*E. coli*) コロニーを、約61kdのTaqポリメラーゼ関連ポリペプチドの温度感受性合成について、シングルコロニー免疫ブロット法によってスクリーニングした。さらに、5' APプロモーター: Taq DNA連結部及び3' Taq DNA: 8T *ery* PPE連結部において、候補プラスミドをDNA配列決定に付した。意図されたDNA配列をコードし温度感受

可能な61kdのTaqポリメラーゼ関連ポリペプチドの合成を誘導するプラスミドの一つを、pLSC68と称した。

## 61kDa のTaq Pol I の発現

pLSC68を含む培養物を、米国特許出願第523,364号で指示され以下の例3に記載されているように増殖させた。61kDaのTaq Pol Iは、41℃での熱誘導の時点で分解しないように思われる。41℃で21時間の後、pLSC68を宿主培養物からの熱処理された粗抽出液は、粗抽出液タンパク質1mgにつき12310単位の熱安定性DNAポリメラーゼ活性を有し、これは未誘導培養物に比べ24倍の増大に当たる。21時間、37℃で誘導されたpLSC68培養物からの熱処理された抽出液は、粗抽出液タンパク質1mgあたり9503単位の活性を有していた。37℃で5時間と21時間の誘導の間では、Taq Pol Iの活性レベルにおいて9倍の増加が見られ、41℃では5時間と21時間の誘導の間では4倍の増大が見られた。同じ全タンパク質及び熱処理された抽出物をSDS-PAGEによって分析した。ゲルの各レーンに対して20µgの粗抽出液タンパク質又は20µgの粗抽出液タンパク質からの熱処理された抽出液を適用した。17℃及び41℃の21時間誘導された全タンパク質レーンの両方に容易に見られる主要バンドは、その熱処理されたものと等しいほどに強いものである。37℃及び41℃の21時間試料から得られた20µgの全タンパク質より熱処理された抽出液は、それぞれ熱安定性DNAポリメラーゼ活性を186単位及び243単位含んでいる。PCRにおける61kDaのTaq DNAポリメラーゼの有用性を見極めるため、pLSC68の誘導された培養物からの熱処理された粗抽出液を用いてPCR検定を行なった。PCRにおける全長Taq Pol Iの供源として、pLSC68の誘導された培養物からの熱処理された粗抽出液を用いた。末端切断酵素4単位及び2単位を使用した反応においてPCR生成物が観察された。全長酵素反応物のいずれにおけるより

もこれらのPCRにおいてより多くの生成物が存在していた。さらに、非特異的なより分子量の高い生成物は全く見えなかった。

## 61kDa のTaq Pol I の精製

誘導されたpLSC68/DG116細胞からの61kDaのTaq Pol Iの精製は、幾分かの修正は加えたが1990年5月15日付の米国特許第523,394号の例1におけるように全長Taq Pol Iの生成と同様に推移した。

誘導されたpLSC68/DG116細胞 (15.6g) を、1990年5月15日付米国特許第523,394号及び以下の例3に記載されているように均質化し溶解させた。分画Iは、1.87gのタンパク質及び1.047×10<sup>6</sup> 位の活性を含んでいた。0.2Mの塩酸アンモニウムの上澄みとして得られた分画IIは、74ml中1.84gのタンパク質及び1.28×10<sup>6</sup> 位の活性を含んでいた。

熱処理に続いて、0.1%になるまでゆっくりとPolyacrylamide (P87.5) を添加した。遠心分離の後、上澄み、分画IIIは155mgのタンパク質と1.48×10<sup>6</sup> 単位の活性を含んでいた。

分画IIIを10ml/cm<sup>2</sup> 毎で1.15×3.1cm (3.2ml) のフェニルセファロースカラム上に負荷した。適用された活性の全てがカラム上に保持されていた。カラムをまず15mlの平衡緩衝液で洗浄し、次にTB中5ml (1.5カラム体積) の0.1M HClで洗浄した。20%のエチレンジグリコールを含むTE中で2Mの尿素でポリメラーゼ活性を抽出させた。ポリメラーゼ活性を伴う分画 (各々0.5ml) をブールシ (8.5ml)、0.1MのHClを含むヘパリンセファロース緩衝液中で透析した。透析した材料、分画IV (12.5ml) は、5.63mgのタンパク質と1.29×10<sup>6</sup> 単位の活性を含んでいた。

分画IVを、上述のように平衡された1.0mlのベッフェル緩衝液のヘパリンセファロースカラム上に負荷した。カラムを6mlの同じ緩衝液 (A...、ベースラインまで) で洗浄し、同じ緩衝液中15mlの塩酸

0.1~0.5 MのKCl 勾配で抽出した。0.16 Mと0.27 Mの間のKCl により抽出する分画 (0.15 ml) をSDS-PAGEで分析した。約47kDa の少  
量の (<1%) 両タンパク質が61kDa の *Isp* Pol I と同時に抽出さ  
れた。0.165 Mと0.255 Mの間のKCl で抽出する分画をプールし、  
2.5 X の微粉吸着剤中でCentricon30 膜上でダイアフィルトレーシ  
ョンした。分画Vは2.80gのタンパク質及び  $1.033 \times 10^4$  位の61  
kDa *Isp* Pol I を含んでいた。

#### 抽出した61kDa の *Isp* Pol I を用いるPCR

0.50gのラムダDNA、各々10poolの2つのラムダ特異的プライマ、  
200  $\mu$ MずつのdNTP、100mMのトリス-HCl、pH8.3、30mMのMgCl<sub>2</sub>、100mM  
のKCl 及び3.5M位の61kDa *Isp* Pol I を含むPCR 反応 (50  $\mu$ l)  
を行なった。比試として、20mMのMgCl<sub>2</sub> 及び50mMのKCl の試験を行  
って上述のように全長 *Isp* Pol I 1.25M位を用いてPCR 反応を行な  
った。制限反応は、95℃で1分、60℃で1分を23サイクル、そし  
て最終の5分の延長時間は75℃であった。一回の反応あたりのDNA  
の量をBiochast 染色法で検定した。全長 *Isp* Pol I  
( $1.4 \times 10^4$  倍の濃度) の場合0.70  $\mu$ gのDNA と比べて61kDa の  
*Isp* Pol I ( $2.2 \times 10^4$  倍の濃度) の場合1.11  $\mu$ gの生成物が得られた。

#### 61kDa の *Isp* Pol I の熱安定性

PCR を模擬した制限条件下で、制限型94kDa の *Isp* Pol I 及  
び61kDa *Isp* Pol I の定常状態熱不活性化を行なった。94kDa の *Isp*  
Pol I は97.5℃で約9分の見かけの半減期を有し、一方61kDa の *Isp*  
Pol I の半減期は、約21分であった。61kDa の *Isp* Pol I の熱不活  
性は、0~300mMの塩濃度にわたりKCl 濃度によって影響されなかつた。  
プラスミドpFC85a~2.68kbの *Hind* III - *Age* 718 フラグメント内に含  
まれたさらにもう1つの末端切除 *Isp* ポリメラーゼ遺伝子を、ATG開  
始コドンに対し、*Isp* pol 遺伝子をコードするアミノ末端 *Hind* III 側

両部位を操作的に切断することによって例えばプラスミド *Fp* pFC85a、  
ATG を用いて発現させることができる。発現時点でこの融合生成物  
は~70,000~72,000ダルトンの末端切除ポリメラーゼを生成する。

この特定の組成は、*Hind* III でプラスミド *Fp* pFC85a を消化させ、dATP  
及びdGTPの存在下で *Hinc*II フラグメントで処理することによって作  
ることができる。得られるフラグメントは、一本鎖は鎖を会合除去  
するためS1スクレアーゼでさらに処理され、生じたDNA は *Age* 71  
8 で消化され、4つのdNTP全てが存在する中で *Hinc*II フラグメント  
で処理される。回収されたフラグメントは、*Sal*I で消化されATG  
開始部位を形成するべくdGTPの存在下で *Hinc*II フラグメントで処理  
された制限されたプラスミド *Fp* pFC85a ATG に対してT4 DNAリガ  
ーゼを用いて連結される。この連結混合物は次に大腸菌 (*E. coli*)  
DG116を形質転換するために用いることができ、形質転換は *Isp* ポ  
リメラーゼの生産のためにスクリーニングされる。発現は、ウェス  
タン免疫ブロット分析及び活性分析によって確認することができる。

#### 例3

##### 末端切除5'→3'エキソヌクレアーゼ欠損 *Isp* ポリメラーゼ (*HE*T284) の組成、発現及び評価

天然 *Isp* DNA ポリメラーゼのアミノ酸1-283が欠けている5'→  
3'エキソヌクレアーゼ欠損 *Isp* DNA ポリメラーゼを発現させるた  
めに、以下の操作を行なった。

プラスミド *Fp* pFC12-1を *Age* 718 (ヌクレオチド位置848) 及び *Hind* III  
(ヌクレオチド位置2629) で消化した。アガロースゲル電気泳動により  
1781塩基対フラグメントを分離した。DNA からアガロースを分離す  
るために、望ましいフラグメントを含むゲル切片を、Costar spinae  
フィルタユニット内で-20℃で凍結させた。産物で溶解した後、マ  
イクロ遠心分離管内でユニットを溶解させた。DNA を含む溶液を

Speed Vac 濃縮器の中で濃縮し、DNA をエタノール沈沈した。

分離されたフラグメントを、*Hinc*II 及び *Hind* III で消化したプラス  
ミド *Fp* pFC12-1にクローニングした。*Hinc*II 消化が、*Bsp*HIでの消化と  
同じ終点末端配列を残すので、前記1781塩基対フラグメントは *Hinc*II  
及び *Hind* III での消化によってプラスミド *Fp* pFC12-1から切り出された  
全長フラグメントと同じ終点末端を有する。消化されたプラスミド  
と分離されたフラグメントとの連結はフラグメントスイッチをひき  
起こし、*p*FC14と呼称されたプラスミドを生成するのに用いられた。

同様の方法で、同じ分離されたフラグメントを *p*FC13にクローニ  
ングすることによりプラスミド *Fp* pFC15を形成した。*p*FC14の場合と  
同様に、*p*FC15は、天然 *Isp* DNA ポリメラーゼのアミノ酸1から2  
83が欠損したポリメラーゼの発現を誘導する；非活性コード配列の  
位置284でメチオニンコドンにおいて翻訳が開始する。

*p*FC14及び *p*FC15の発現プラスミドは同様に高いレベルで、約70  
kDa の分子量の5'→3'エキソヌクレアーゼ活性の強い生物学的  
に活性な熱安定性DNA ポリメラーゼを発現した；プラスミド *Fp* pFC15  
は、*p*FC14より高いレベルでポリメラーゼを発現した。3'→5'  
エキソヌクレアーゼ活性によって与えられて必要である3つのドメイン  
全てにおけるアミノ酸配列モチーフの保存、エキソヌクレアーゼ  
活性によって与えられて位置1のドメインに至るまでのアミノ末  
端からの切断、及び発現されたタンパク質の長さといった大腸菌  
(*E. coli*) Pol I の *Hinc*II フラグメントとの類似性に基づくと、  
*Isp* DNA ポリメラーゼの類似形態 (*HE*T284) は、3'→5'のエキ  
ソヌクレアーゼ又はブルーフリーディング活性を示すが5'→3'  
エキソヌクレアーゼ機能が欠如している。初期SDS 活性ゲル検定及  
び3'→5'エキソヌクレアーゼ活性についての確認検定は、プラ  
スミド *Fp* pFC15を宿主大腸菌 (*E. coli*) 宿主細胞によって発現され

たポリメラーゼのブルーフリーディング活性のレベルの低下を示唆  
する。

*HE*T284 *Isp* DNA ポリメラーゼを、プラスミド *Fp* pFC15を含む大腸菌  
(*E. coli*) 菌株DG116 から培養した。10Lの発酵のための組織フ  
ラスコには、トリプトン (20g/l)、酵母抽出物 (10g/l)、  
NaCl (10g/l)、グルコース (10g/l)、アンピシリン (50g  
/l)、チアミン (10g/l) が含まれた。組織フラスコには、  
天平秤からのコロニーを接種した (接種したグリセロール培養を使  
用することもある)。組織フラスコを0.5 O.D.~2.0 O.D. (A<sub>600</sub>)  
まで30℃で増殖させた。発酵槽内に接種された組織培養の量は、  
約40%が0.50gの乾燥重量/リットルとなるように計算される。10  
リットルの組織培養は、250mMのMg<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、100mMの(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、40mMの  
クエン酸ナトリウム、0.4mMのFeCl<sub>3</sub>、0.04mMのZnCl<sub>2</sub>、0.03mMの  
CoCl<sub>2</sub>、0.03mMのCuCl<sub>2</sub> 及び0.03mMのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を含んでいた。以下の  
ような無菌成分を付加した：40mMのMgSO<sub>4</sub>、20g/lのグルコース、  
200g/lのチアミン及び500g/lのアンピシリン。pHはNaOHで6.8  
に調整され、添加したMg<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> により発酵中調整された。Mg<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 添加  
に調整付けることによってグルコースを段階的に添加した。前培養  
として必要に応じてプロピレングリコールを付加することにより、  
発酵を開始した。培養液濃度は40%に維持した。

発酵槽には上述のように操作を行ない、増殖を30℃で0.5~1.0  
 $\times 10^4$ 細胞/mlの細胞密度 (15の光学密度 (A<sub>600</sub>)) まで増殖さ  
せた。増殖濃度は *HE*T284 *Isp* DNA ポリメラーゼの合成を促進するた  
め38℃まで移行させた。濃度の移行は *p*FC15プラスミドのコピー数  
を増大させ、同時に、宿主内の欠陥プロファージ機構によりコード  
された温度感受性CI抑制因子の不活性化を促進して変異された *Isp* DNA  
ポリメラーゼ遺伝子の転写を制御するラムダP<sub>1</sub> プロモーターを抑制

除去する。

細胞は6時間37 (A<sub>549</sub>)の発芽細胞まで増殖させ、適量分回によって傾倒した。細胞マスを (ca. 95 g/l) を、50mM トリス-Cl, pH7.5, 30mM のEDTA及び20% (w/v) のグリセロールを含む緩衝液の管口の中に再懸濁させた。細胞液をゆっくりと緩衝液中に滴下させ、「ビーズ」すなわち小さいベレットとして細胞液を回収させた。細胞懸液を-70℃で保存した。

細胞ビーズ 100 g (100 g の細胞懸液を含む) に対し、100 ml の1×TE (50mM のトリス-Cl, pH7.5, 10mM のEDTA) 及び0.3mM までのDTT, 2.0mM までのPMSF, 1 µg/ml までのロイペプチン及び0.3mM までのTLCR (プロテアーゼインヒビター) を添加した。試料を氷上で溶解し、低速でブレンダー内で均質に同懸濁させた。20000 psi でMiles フレンツプレスのセル内で、細胞懸液を均質させた。細胞液を減少させるため、抽出した細胞試料を、各々50%の負荷率、70%の出力で3分間4回分回処理した。1mM のDTT, 2.0mM のPMSF, 1 µg/ml のロイペプチン及び0.2mM のTLCRを含む1×TEを用いて550 ml になるまで分回処理物を抽出した (分回I)。

0.3M までの酢酸アンモニウムを添加した後、協とうしている水浴の中で粗抽出液を急速に75℃にし、15分間75℃の水浴へ移送して大腸菌 (E. coli) 宿主タンパク質を変性し不活性化した。抽出液された試料を、急速に0℃まで冷やし20分間氷上で保持した。沈降したタンパク質及び細胞液を5℃で30分間20,000×Gでの遠心分離により除去し、上澄み (分回II) を保存した。

処理された上澄み (分回II) を、大部分のDNA 及びRNA を除去すべくポリエチレンイミン (PEI) で処理した。急速に沈降しながら、0℃で437 ml の分回III にPolysin P (10% (w/v) 34.96 ml, pH7.5) をゆっくりと添加した。0℃で30分間の後、30分間20,000×Gで試

料を遠心分離した。50mM のトリス-Cl, pH7.5, 0.3M の酢酸アンモニウム、10mM のEDTA及び1mM のDTT 内で平均化された100 ml のフェニルセファロースカラム (3.2×12.5 cm) に対し80 ml/時で上澄み (分回II) を適用した。同じ緩衝液中の200 ml で (A<sub>549</sub>、ベースラインまで) でカラムを洗脱し次に150 ml の50mM トリス-Cl, pH7.5, 100mM のKCl, 10mM のEDTA及び1mM のDTT で洗脱した。次に、50mM のトリス-Cl, pH7.5, 2M の尿素、20% (w/v) のエチレングリコール、10mM のEDTA、及び1mM のDTT を含む緩衝液中からカラムからHET284 *lga* DNAポリメラーゼを抽出し、DNA ポリメラーゼ活性を含む分回をブールした (分回IV)。

50mM トリス-Cl, pH7.5, 1mM のEDTA、及び1mM のDTT 中で50mM のKCl と同等の塩母液に分回IVを調製した。同じ緩衝液中で平均化された15 ml のヘパリン・セファロースカラムに対して (9 ml/時) で試料を適用した。カラムを約140 ml/時 (3.5 カラム体積) で同じ緩衝液中で洗脱し、同じ緩衝液中で150 ml の0.05~0.5M のKCl 勾配で抽出した。DNA ポリメラーゼ活性は、0.11M~0.32M の間のKCl で抽出した。p10a15でコードされた変種 *lga* DNAポリメラーゼを含む分回をブールし、濃縮し、2.5×10<sup>6</sup>倍濃縮液 (50mM のトリス-Cl, pH8.0, 250mM のKCl, 0.25mM のEDTA, 2.5mM のDTT 及び0.5% のTween 20) に対しダイアフィльтраーションし、その後1.5倍の濃縮80% (w/v) グリセロールと混合し、-20℃で保存した。場合によっては、ヘパリンセファロース抽出されたDNA ポリメラーゼ又はフェニルセファロース抽出されたDNA ポリメラーゼを透析するか又は50mM トリス-Cl, pH7.5, 1mM のDTT, 1mM のEDTA及び0.2% のTween 20中50mM のKCl と同等の塩母液に同様に、同じ緩衝液中で平均化されたアフィゲルブルーカラムに適用する (100 ml のタンパク質/1 ml の樹脂) ことができる。カラムを、同じ緩衝液3~5カ

ラム体積で洗脱し、同じ緩衝液中10カラム体積のKCl 勾配 (0.05M~0.1M) で抽出した。DNA ポリメラーゼ活性を含む分回 (0.25M から0.4M までのKCl で抽出する) をブールし、濃縮し、ダイアフィльтраーションし、上述のように保存した。

細胞のDNA ポリメラーゼの相対的な耐熱性を比較した。97.5℃で天然 *lga* DNAポリメラーゼの半減期は、天然又は組換え型 *lga* DNA (すなわちAmp<sup>r</sup> *lga*) DNAポリメラーゼの半減期の2倍以上である。置くべきことに、HET284 *lga* DNAポリメラーゼの97.5℃での半減期は、天然 *lga* DNAポリメラーゼの半減期より、2.5~3倍長い。

10mM のトリス-Cl, pH8.3 及び1.5mM のNaCl (天然又は天然 *lga* DNAポリメラーゼについて) 又は3mM のNaCl (HET284 *lga* DNAポリメラーゼについて)、50mM のKCl (天然 *lga*、天然 *lga* 及びHET284 *lga* DNAポリメラーゼについて) 又はKCl 無し (HET284 *lga* DNAポリメラーゼについて)、各々0.5 µM のプライマーPCR01 及びPCR02, 1 µg のラムダ複製DNA、各々200 µM のdNTP (dCTPを除く) 及び各々4 µg の制限を含むPCR 管を、0~60分間、大型水浴内で97.5℃で保温した。時間の経過につれて、試料をひき出し、0℃で保存し、収量活性について5 µl を収量活性検定において10分間75℃で検定した。

天然 *lga* DNAポリメラーゼが97.5℃で約21~22分の半減期を有していたのに対して、*lga* DNAポリメラーゼは、97.5℃で約10分の半減期を有していた。置くべきことに、*lga* DNAポリメラーゼのHET284 変種は、天然又は天然 *lga* DNAポリメラーゼのいずれよりも長く長い半減期 (50~55分) を有していた。HET284 *lga* DNAポリメラーゼの改良された耐熱性は、PCR 管に、目的及びPCR 生成物の配列の完全な復元のために必要とされる複分回温度が酵素の不活性化を遅くするためにG+Cの富含な領域を目的とするのが困難である場合に、応用される。

10mM のトリス-Cl, pH8.3, 3mM のNaCl, 200 µM ずつのdNTP, 0.5 µg のバクテリオファージラムダDNA, 0.5 µM のプライマーPCR01, 4 µg のHET284 *lga* DNAポリメラーゼ及び0.5 µM のプライマーPCR02 又はPL10を50 µl 含むPCR 管を、1分間96℃の活性化温度及び2分間60℃のアニーリング-延長温度を用いて25サイクル循環させた。ラムダDNA複製、デオキシスクレオチド貯蔵液及びプライマーPCR01 及びPCR02 は、PECI Gene Amp キットの一部分を成していた。プライマーPL10は次の配列を有している: 5' -GGGCTACCTTTGCTCAGGGCAAC-3' (配列番号: 25)。又はこれはバクテリオファージラムダスクレオチド8106-8130に対し相対的である。

プライマーPCR01 及びPCR02 は、ラムダから500bp生成物を増殖する。プライマーPCR01 及びPL10はラムダから1 kb生成物を増殖する。それぞれのプライマー組での増殖の後、5 µl のアリコートを手動でアガロースゲル電気泳動に付し、臭化エチジウム染色で特定の位置された生成物バンドを視覚化した。両方のプライマー組で同様なレベルの生成物が生成され、HET284 *lga* DNAポリメラーゼが立固められた目的配列をうまく増殖したことが示された。

#### 例4

##### 変種HET284 *lga* DNAポリメラーゼの発現

HET 140 の図解を開始する *lga* DNAポリメラーゼの5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠陥変種を表現するため、アミノ酸1から139に相当するコード領域を発見ベクターから欠失させた。このような欠失を形成するためのプロトコルは、例2及び3に記述されている領域に類似している: すなわち、増殖された遺伝子フラグメントを切り出し、次に全長フラグメントが切除されたベクター内にこれを再挿入する。しかしながら、増殖されたフラグメントは、制限消化から増殖するのではなくむしろPCR 増殖生成物として得ることが

できる。この方法論は、新しい上流制限部位（又はその他の配列）が有用な場合にこれを取り込むことができる。

位置 140にあるメチオニンコドンまでの領域を欠失させるために、PCR を用いて pTaa12-1 及び pTaa13 内に SpeI 部位を導入した。Iaa DNA ポリメラーゼ配列 号: 3 (FL63) のヌクレオチド 409-436 に対応する順方向プライマを、位置 140のメチオニンコドンのちょうど上流で SpeI 部位に導入するよう設計した。Iaa DNA ポリメラーゼ配列 号: 3 (FL69) のヌクレオチド 608-634 の相補体に一致する逆プライマは、位置 621で XbaI 部位を含むように選択された。SnaI で線状化されたプラスミド pTaa12-1 を PCR 陽型として用い、約 225bp の PCR 生成物を生成せしめた。

消化の前に、PCR 生成物を PCR 反応混合物中でプロテイナーゼ K 50  $\mu$ g/ml に 0.5% の SDS 及び 5 mM の EDTA を加えたもので処理した。37℃ で 30 分間保温した後、プロテイナーゼ K を 10 分間 68℃ で熱不活性化した。この手間は、次の制限消化を抑制する可能性のある生成物に結合したあらゆる Taq ポリメラーゼを除去した。緩衝液は TE 緩衝液に変えられ、余分な PCR プライマは Centricon 100 マイクロ濾過器で除去された。

増幅したフラグメントをまず SpeI で消化し、次に SpeI 閉鎖末端で平滑末端を形成すべく Klenow で処理し、最後に XbaI で消化した。得られたフラグメントを、HcoI で消化されたプラスミド pTaa13 (pTaa12-1 でも可) に連結させ、Klenow で修復し、次に XbaI で消化した。連結は、HcoI 部位（コード配列の第 1 のメチオニンコドン）及び導入された SpeI 部位（位置 140 のメチオニンコドンの上流）に続く領域が欠失された状態で、フレーム内コード配列を生成した。得られた発現ベクターは pTaa16 と呼称された。

この例で使用されるプライマは以下にそして配列表の節で示され

て行なわれた。

得られた円形フラグメントをニトロセルロースフィルタ上の平板形変換によって DG101 宿主細胞へと形変換させた。懸液フィルタを作り、正しいプラスミドの存在を  $^{32}$ P-リン酸化プローブ (FL65) で調査することによって検出した。得られたベクターは、pTaa19 と呼称された。

pTaa19 からの RBS マイナス部分は、HcoI / XbaI フラグメントスニッチを介して pTaa12-1 へとクローニングした。HcoI 及び XbaI でプラスミド pTaa19 を消化し、上述の例 3 のようにゲル電気泳動により 620bp フラグメントを精製した。プラスミド pTaa12-1 を HcoI、XbaI、及び XbaI で消化した。XbaI 閉鎖は、「粘着」末端を連結するのに適した条件下（希釈リガーゼ及び 40  $\mu$ M の ATP）で行なわれる。その後の連結段階を目的として、RBS+フラグメントを不活性化させる。最終的に、連結生成物は、発現のため DG116 宿主細胞に形変換され、pTaa19-RBS と呼称される。

この例で用いられるオリゴヌクレオチド配列は、以下にそして配列表の節で列挙される。

| オリゴ  | 配列番号:    | 配列  |
|------|----------|---|
| FL64 | 配列番号: 28 | 5' CTGAACCATGCTTTTGACCC<br>GCTTACATCAATAT |
| FL65 | 配列番号: 29 | 5' TAGTAACCCGCTGACAAAG                    |

#### 例 6

末端切除型 Iaa DNA ポリメラーゼ HET-ASP21 及び HET-GLQ74 の発現

Iaa DNA ポリメラーゼ遺伝子コード配列の位置 21 においてアスパラギン酸コドンで翻訳開始を行なうために、このコドンの前にメチオニンコドンを導入して、最初の HcoI 部位からこの導入されたメチオニンコドンまでの領域を欠失させる。例 4 と同様に、欠失法には、570 塩基対生成物を生成するため HcoI 部位とメチオニンコド

る。

| プライマ | SEQ ID NO: | 配列                                   |
|------|------------|--------------------------------------|
| FL63 | 配列番号: 26   | 5' GATAAAGGCATGCTTCAGCCTT<br>CTCAACG |
| FL69 | 配列番号: 27   | 5' TCTACTTCTCTGAGAGCTCAA<br>CAGCAG   |

#### 例 5

HET140 発現ベクター中の望ましくない RBS の除去

位置 140 のメチオニンコドンの上流のリボソーム結合部位 (RBS) を除去することによって、Iaa DNA ポリメラーゼの HET140 形態の発現の低減を達成することができる。RBS は、アミノ酸配列を定めることなくオリゴヌクレオチド部位特異的変異誘発を介して除去された。遺伝子コードの縮重性を利用して、核酸配列を変えるべくコドンの第 3 の位置に変化をもたらすことができ、かくしてコードされたタンパク質のアミノ酸配列を変えることなく RBS を除去することができる。

変更された配列を含む変異誘発性プライマ (FL64) を合成し、リン酸化した。Stratagene から市販されているヘルパーファージ R408 と同時感染させることによって、一本鎖の pTaa09 (HcoI 部位を有する全長クローン) を調製した。一本鎖 pTaa09 と pBS13+ の PvuII 消化物からの大きなフラグメントの「ギャップを有する 2 重鎖」を、まず 2 つのプラスミドを混合し、2 分間沸とうするまで加熱し、5 分間 65℃ まで冷却することによって形成した。次に、リン酸化したプライマを混合し 2 分間 80℃ まで加熱し、その後ゆっくりと室温まで冷却することにより「ギャップを有する 2 重鎖」とアニーリングさせた。Klenow の延長により残留するギャップをフィリングし、フラグメントを T4 DNA リガーゼで連結した。これらの反応は両方共、30 分間 37℃ で緩衝液中 200  $\mu$ M ずつの dNTP と 40  $\mu$ M の ATP の中

ンを取り込むよう設計された上流プライマ (FL66) 及び上述の同じ下流プライマ (FL69) を用いる PCR が含まれた。

増幅した生成物を、余分なプライマ及び緩衝液を除去するため Centricon-100 マイクロ濾過器で濃縮した。生成物を Speed Vac 濃縮器で濃縮し、次に消化混合物中に再懸濁した。増幅生成物を HcoIV 及び XbaI で消化した。同様にして、pTaa12-1、pTaa13、又は pTaa19-RBS を同じ 2 つの制限酵素で消化した。消化し増幅されたフラグメントを消化された発現ベクターに連結した。得られた構成体は、天然 Iaa コード配列の出発コドンの上流の HcoI 部位から天然 Iaa コード配列の位置 21 においてアスパラギン酸コドンの上流に導入された新しいメチオニンコドンまでの欠失を有している。

同様にして、翻訳開始が G1a74 つまり天然 Iaa コード配列の位置 74 におけるグルタミン酸コドンで始まるような形で、欠失変異体を作製した。上流プライマ (FL67) はメチオニンコドンと HcoI 部位を G1a74 の前に導入するように設計される。使用された下流プライマ及びクローニングプロトコルは、HET-ASP21 構成体について上述した通りである。

この例で用いられた上流プライマ配列は、以下にそして配列表の節に列挙する。

| オリゴ  | 配列番号:    | 配列                                     |
|------|----------|--|
| FL66 | 配列番号: 30 | 5' CTATGCCATGGATACATCGCT<br>TTCTACTTCC |
| FL67 | 配列番号: 31 | 5' CAGGCCCATGGCAACTTACAA<br>GGCTCAAGA  |

#### 例 7

末端切除型 Iaf ポリメラーゼの発現

5' → 3' エクソヌクレアーゼ活性が欠如している Iaf ポリメラーゼのミューテイン形態を Iaf ポリメラーゼ遺伝子の 5' 末端に欠

失を導入することによって構成した。以下のプロトコルを用いて 279及び417の両方の塩基対欠失を作った。すなわち、望まれるフラグメントを切除するため制限酵素で発現プラスミドを消化し、平末端を生成するべくフラグメント末端をHesoo及び4つのdHTP全てを用いて、復し、望まれる欠失を伴う新しい円形プラスミドを生成するべく生成物を連結した。93キログルトンのTafポリメラーゼの5'→3'エキソスクレアーゼ欠損形態を発現するため、アミノ酸2-93を含む279bp欠失を生成させた。88キログルトンのTafポリメラーゼの5'→3'エキソスクレアーゼ欠損形態を発現するためには、アミノ酸2-139を含む417bp欠失を生成させた。

コドン2-93が欠失されたプラスミドを作るためには、Hco I及びHde IでpTaf03を消化し、末端をHesoo処理により修復した。消化され修復されたプラスミドを5 µg/mlまで希釈し、平滑末端条件下で連結した。希釈したプラスミド濃度は、分子間連結に有利に作用する。連結されたプラスミドをDG116に形質転換した。ミニスクリーンDNA調製物を制限分析に付し、適切なプラスミドをDNA配列分析によって確認した。pTaf03からセグメントを欠失させることにより生み出された、得た発現ベクターはpTaf09と呼称された。pTaf03から作製された類似のベクターはpTaf10と呼称された。

コドン2-139が欠失した発現ベクターも作製した。最初の制限消化がHco I及びHde Iで行なわれるという点を除き、同じプロトコルを用いた。pTaf03から作製された発現ベクターはpTaf11と呼称され、pTaf05から作製された発現ベクターはpTaf12と呼称された。

65℃までステップ循環させ、2分間保持する。

プロファイルを25サイクル反復する。

最後のサイクルの後、5分間保持する。

アガロースゲル電気泳動により選別された1.65kbのPCR生成物を精製し、フェノール-クロロホルム抽出とエタノール沈殿の後、回収した。精製された生成物を、制限エンドスクレアーゼHde I及びHcl IIで消化し、Hde I / BamHI 消化され脱リン酸されたプラスミドベクターpUC164と連結させる(1989年12月22日付の米国特許第455,967号、例6B;引用によりこの明細書に組み入れる)。大腸菌(*E. coli*)菌株DG116のアンピシリン耐性形質転換体を30℃で選択し、望ましい複製型プラスミドについてスクリーニングした。プラスミドpZ05A292は、例2のPL368でコードされたタンパク質と類似した、544アミノ酸、5'→3'エキソスクレアーゼ欠損テルムス(*Thermus*)スペーススZ05熱安定性DNAポリメラーゼをコードする。DNAポリメラーゼ活性は、例2と同様に精製される。精製されたタンパク質は、5'→3'エキソスクレアーゼ活性が欠損しており、対応する天然酵素に比べ耐熱性があり、G+Cの豊富な鎖型のPCRにおいて特に有用である。

| プライマ   | 配列番号:    | 配列  |
|--------|----------|---|
| T2A292 | 配列番号: 32 | CTCGCCATATGCGCTCGCTCCTCTTACAGCAG<br>GCCCGCTGGCCGCGCCG |
| T2R01  | 配列番号: 33 | GACGCGAGTCTCAGCCCTTGGCCGGAAGCCAC<br>TCCTC             |

#### 例9

アミノ酸288~830を含むテルムス(*Thermus*)スペーススsp17の5'→3'エキソスクレアーゼ欠損熱安定性DNAポリメラーゼの誘導と発現

テルムス(*Thermus*)スペーススsp17から5'→3'エキソス

#### 例8

5'→3'エキソスクレアーゼ欠損熱安定性DNAの誘導と発現  
アミノ酸292から834までを含むテルムス(*Thermus*)スペーススZ05のポリメラーゼ

テルムス(*Thermus*)スペーススZ05からの5'→3'エキソスクレアーゼ欠損熱安定性DNAポリメラーゼをコードするDNAフラグメントを得るために、アミノ酸292から834を含むDNAポリメラーゼ遺伝子の一部分を、10mMのトリス-HCl pH8.3、50mMのKClを含む100 µlの鉱油の上に被さった80 µlの溶液:

50pmolesのT2A292

50pmolesのT2R01

10ngのテルムス(*Thermus*)スペーススZ05ゲノムDNA

2.5単位のAmpliTaq DNAポリメラーゼ

各々50 µMのdATP, dGTP, dCTP, dTTP

中で順方向プライマT2A292及び逆方向プライマT2R01を伴うPCRにおいて選択的に増幅させた。反応は、80℃の予熱されたサイクラー内に管を入れた後7.5mMのNaClを含む20 µlを添加することによって開始された。

ゲノムDNAを、制限エンドスクレアーゼAseIで完全に消化し、5分間98℃で底性させ、0℃まで急速に冷却した。試料を、以下のプロフィールに従ってPerkin-Elmer Cetusサーマルサイクラーの中で循環させた:

96℃までステップ循環させ、20秒間保持する。

55℃までステップ循環させ、30秒間保持する。

30秒にわたり72℃まで上昇させ1分間保持する。

このプロフィールを3サイクル反復する。

96℃までステップ循環させ、20秒間保持する。

スクレアーゼ欠損熱安定性DNAポリメラーゼをコードするDNAフラグメントを得るためには、アミノ酸288~830を含むDNAポリメラーゼの一部分を、10mMのトリス-HCl pH8.3、50mMのKClを含む100 µlの鉱油の上に被さった80 µlの溶液:

50pmolesのT2A288

50pmolesのT2R01

10ngのテルムス(*Thermus*)スペーススsp17ゲノムDNA

2.5単位のAmpliTaq DNAポリメラーゼ、

各々50 µMのdATP, dGTP, dCTP, dTTP、

中で順方向プライマT2A288及び逆方向プライマT2R01を用いるPCRにおいて選択的に増幅させた。80℃の予熱されたサイクラー内に管を入れた後7.5mMのNaClを含む20 µlを添加することによって反応を開始した。

ゲノムDNAを98℃で5分間底性し、0℃まで急速に冷却させた。以下のプロフィールに従ってPerkin-Elmer Cetusサーマルサイクラー内で、試料を循環させた:

96℃までステップ循環させ、20秒間保持する。

55℃までステップ循環させ、30秒間保持する。

30秒にわたり72℃まで上昇させ1分間保持する。

プロフィールを3サイクル反復する。

96℃までステップ循環させ、20秒間保持する。

65℃までステップ循環させ、2分間保持する。

プロフィールを25サイクル反復する。

最後のサイクルの後5分間保持する。

アガロースゲル電気泳動法により、選別された1.65kbのPCR生成物を精製し、フェノール-クロロホルム抽出及びエタノール沈殿の後回収した。精製された生成物を、制限エンドスクレアーゼHde I及

び *Bcl*I で消化し、*Eco*RI/*Bam*HI で消化され脱リン酸されたプラスミドベクター pCG164 に連結した (1989年12月12日出願の米国特許出願第 455,967号、例6B)。大腸菌 (*E. coli*) 菌株 DG116 のアンピシリン耐性形質転換体を30℃で選択し、望ましい組換えプラスミドについてスクリーニングした。プラスミド pSP5A288は、例2の pLSC8 でコードされたタンパク質と類似した、544 アミノ酸、5'→3' エキソスクレアーゼ欠損 *Thermus* (*Thermus*) スペーシス *sp*17 熱安定性DNAポリメラーゼをコードする。DNAポリメラーゼ活性を、例2と同様に精製する。精製されたタンパク質は5'→3' エキソスクレアーゼ活性が欠損しており、対応する天然酵素に比べ耐熱性が高く、G+Cの豊富な鋳型のPCRにおいて特に有用である。

| プライマ   | 配列番号:    | 配列   |
|--------|----------|--|
| TSA288 | 配列番号: 34 | CTCGGCATATGGCTCTCTAAAGAAGCTGAGGAG<br>GCCCGCTGGCCCGCC |
| TS001  | 配列番号: 35 | GACCCAGATCTCAGGCCCTGGCCGAAAGCCAG<br>TCTTC            |

## 例10

アミノ酸292から834を含む *Thermus thermophilus* (*Thermus thermophilus*) の5'→3' エキソスクレアーゼ欠損熱安定性DNAポリメラーゼの精製と発現

*Thermus thermophilus* (*Thermus thermophilus*) から5'→3' エキソスクレアーゼ欠損熱安定性DNAポリメラーゼをコードするDNAフラグメントを得るために、アミノ酸292~834を含むDNAポリメラーゼ遺伝子の一部分を、10mMのトリス-HCl pH8.3、50mMのKClを含む上に100μLの紅血球が被さっている80μLの溶液:

50pmolesのTZA292

50pmolesのDC122

1ngの *Eco*RI消化されたプラスミド pLSC22

pLSC8 でコードされたタンパク質と類似した、544 アミノ酸、5'→3' エキソスクレアーゼ欠損 *Thermus thermophilus* (*Thermus thermophilus*) 熱安定性DNAポリメラーゼをコードする。DNAポリメラーゼ活性を、例2と同様に精製する。精製されたタンパク質は5'→3' エキソスクレアーゼ活性が欠損しており、対応する天然酵素に比べ耐熱性が高く、G+Cの豊富な鋳型のPCRにおいて特に有用である。

| プライマ   | 配列番号:    | 配列   |
|--------|----------|--|
| TZA292 | 配列番号: 32 | CTCGGCATATGGCTCTCTCTTGGAGAG<br>GCCCGCTGGCCCGCC |
| DC122  | 配列番号: 36 | CCTCTAAGCGGCAGATCTGATATCAACCTTG<br>GCCGAAAGC   |

## 例11

アミノ酸285~892を含む *Thermophilus africanus* (*Thermophilus africanus*) の5'→3' エキソスクレアーゼ欠損熱安定性DNAポリメラーゼの精製と発現

*Thermophilus africanus* (*Thermophilus africanus*) から5'→3' エキソスクレアーゼ欠損熱安定性DNAポリメラーゼをコードするDNAフラグメントを得るためには、アミノ酸285~892を含むDNAポリメラーゼ遺伝子の一部分を、10mMのトリス-HCl pH8.3、50mMのKClを含む100μLの紅血球が上に被さった80μLの溶液:

50pmolesのTAF1285

50pmolesのTAFR01

1ngのプラスミド pBSH: TAFRV3 DNA

2.5 単位の *Amp*II Taq DNA ポリメラーゼ

各々50μMのdATP, dGTP, dCTP, dTTP

中で順方向でプライマTAF1285及び逆方向プライマTAFR01を用いるPCRにおいて選択的に増幅させる。80℃の予熱されたサイクラー内

2.5 単位の *Amp*II Taq DNA ポリメラーゼ

各々50μMのdATP, dGTP, dCTP, dTTP

中で順方向プライマTZA292及び逆方向プライマDC122を用いるPCRにおいて選択的に増幅させる。80℃の予熱されたサイクラーの中に管を入れた後、7.5mMのMgCl<sub>2</sub>を含む20μLを付加することによって反応を開始させた。

プラスミド pLSC22(1989年12月22日出願の米国特許出願第 455,967号; この記載は引用により本明細書に組み込まれる)を制限エンドスクレアーゼ *Eco*RIで完全に消化し、98℃で5分間変性し、急速に0℃まで冷却した。以下のプロフィールに従って、Perkin-Elmer Cetus サーマルサイクラー内で、試料を循環させた:

96℃までステップ循環させ、20秒間保持する。

55℃までステップ循環させ、30秒間保持する。

30秒にわたり72℃まで上昇させ1分間保持する。

プロフィールを3サイクル反復する。

96℃までステップ循環させ、20秒間保持する。

65℃までステップ循環させ2分間保持する。

プロフィールを25サイクル反復する。

最後のサイクルの後5分間保持する。

アガロースゲル電気泳動法により、意図された1.66kbのPCR生成物を精製し、フェノールクロロホルム抽出及びエタノール沈殿の後回収する。精製された生成物を、制限エンドスクレアーゼ *Eco*RI及び *Bcl*Iで消化し、*Eco*RI/*Bam*HIで消化され脱リン酸されたプラスミドベクター pCG164に連結する (1989年12月12日出願の米国特許出願第 455,967号、例6B)。大腸菌 (*E. coli*) 菌株 DG116 のアンピシリン耐性形質転換体を30℃で選択し、望ましい組換えプラスミドについてスクリーニングする。プラスミド pTTA292は、例2の

に管を入れた後7.5mMのMgCl<sub>2</sub>を含む20μLを付加することによって反応を開始させた。

プラスミド pBSH TAFRV3 (Cetus CASE2583, 1, EX4, p53内に記されている通りに得られたもの; 引用により本明細書に組み入れる)を完全に *Eco*RIで消化し、DNAを98℃で5分間変性させ、0℃まで急速に冷却した。以下のプロフィールに従ってPerkin-Elmer Cetusサーマルサイクラー内で試料を循環させた。

95℃までステップ循環させ、30秒間保持する。

55℃までステップ循環させ、30秒間保持する。

30秒にわたり72℃まで上昇させ、1分間保持する。

プロフィールを3サイクル反復する。

95℃までステップ循環させ、30秒間保持する。

65℃までステップ循環させ、2分間保持する。

プロフィールを20サイクル反復する。

最後のサイクルの後、5分間保持する。

アガロースゲル電気泳動法により、意図された1.86kbのPCR生成物を精製し、フェノールクロロホルム抽出及びエタノール沈殿の後回収する。精製された生成物を、制限エンドスクレアーゼ *Eco*RI及び *Bam*HIで消化し、*Eco*RI/*Bam*HIで消化され脱リン酸されたプラスミドベクター pCG164に連結する (1989年12月22日出願の米国特許出願第 455,967号、例6B)。大腸菌 (*E. coli*) 菌株 DG116 のアンピシリン耐性形質転換体を30℃で選択し、望ましい組換え型プラスミドについてスクリーニングする。プラスミド pTAF1285は例3の pTH15 でコードされたタンパク質と類似した、609 アミノ酸、5'→3' エキソスクレアーゼ欠損 *Thermophilus africanus* (*Thermophilus africanus*) 熱安定性DNAポリメラーゼをコードする。DNAポリメラーゼ活性を、例3と同様に精製される。精製されたタ

ンパク質は5'→3' エキソヌクレアーゼ活性が欠損しており、対応する炎症性疾患に比べて耐熱性が高く、G+Cの置換な割合のPCにおいて特に有用である。

**プライマ** **配列番号:** **塩基**  
 TAP1285 **配列番号:** 37 **塩基** GTCCGGCATATGATTAGAACTTAATTACAA  
 GAAAAATTACGAAAGG  
 TAP801 **配列番号:** 38 **塩基** CCTTACCCGAGGATCTGATTCCTCCTCTT  
 TCCATAATAAGCAT

以上の明細書は当業者が本発明を実施できるようにするのに充分なものであると考えられる。本発明は、寄託された細菌系によってその菌種が限定されるものではない。寄託された菌種は本発明の一菌種を以て例示するためのものであり、口能的に等価のあらゆる細菌系が本発明の菌種内に入るものである。ここで、材料の寄託は、本明細書に合されている記述が本発明の改良の態様を含むあらゆる菌種の実施を可能にするのに不相当であることを容認するものではなく、又、寄託はそれが代表している特定の例に請求の菌種を制限するものであるとみなされるべきものではない。従って、本明細書に示した記述したものに於いて、当業者には、前述の説明から本発明のさまざまな変形態様が明らかになると思われ、これらの変形態様は、添付のクレームの範囲内に入るものである。

Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Gly Gly 63 70 75 80  
 TAC AAC CCC GCG CCC CCC ACC GCG GAG CAC TTT CCC GCG CAA CTC 188  
 Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Glu Leu 95  
 GCG CTC ATC AAC GAG CTC GTG GAC CTC CTC GCG CTC GCG GCG CTC GAG 336  
 Ala Leu His Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Leu Ala Arg Leu Glu 100 110  
 GTC GCG GCG TAC GAG GCG GAG GAC CTC CTC GCG ACC CTC GCG AAG AAC 384  
 Val Pro Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Ser Leu Ala Lys Lys 115 125  
 GCG CAA AAG GAG GCG TAC GAG CTC GCG ATC CTC ACC GCG GAG AAA GAG 432  
 Ala Glu Lys Glu Gly Tyr Glu Val Arg His Leu Thr Ala Asp Lys Asp 130 135 140  
 CTT TAC CAG CTC CTT TCC GAG CCC ATC CAC CTC CTC CAC CCC GAG GCG 480  
 Leu Tyr Glu Leu Leu Ser Asp Arg His His Val Leu His Pro Glu Gly 145 150 155 160  
 TAC CTC ATC ACC GCG GCG TCG CTT TCG GAA AAG TAC GCG CTC ACC GCG 528  
 Tyr Leu His Thr Pro Ala Trp Leu Trp Glu Lys Tyr Gly Leu Arg Pro 165 170 175  
 CAG CAG TCG GCG GAG TAC GCG GCG CTC ACC GCG GAG GAG TCG GAG AAC 576  
 Asp Glu Trp Ala Asp Tyr Arg Ala Leu Thr Gly Asp Glu Ser Asp Asn 180 190  
 CTT GCG GCG CTC AAG GCG ATC GCG GAG AAG AGG GCG AAG CTT CTC 624  
 Leu Pro Gly Val Lys Gly His Gly Glu Lys Thr Ala Arg Lys Leu Leu 195 200 205  
 CAG CAG TCG GCG ACC CTC GAA GCG CTC CTC AAG AAG CTC CAC GCG CTC 672  
 Glu Glu Trp Gly Ser Leu Glu Ala Leu Leu Lys Asn Leu Asp Arg Leu 210 215 220  
 AAC GCG GCG ATC GCG GAG AAG ATC CTC GCG CAG ATC CAC GAT CTC AAC 720

## (2) 配列番号: 1:

## (1) 配列の特徴:

(A) 長さ: 2499 塩基対

(B) 塩: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(E) 分子の重: DNA (genomic)

(F) ハイボセティカル: 50

(G) アンチセンス: 50

(H) 由来:

(A) 生物: *Theraps aquaticus*

(I) 特徴:

(A) HARB/key: C05

(B) 位置: 1..2496

(ii) 配列の記号: 配列番号: 1:

ATC AGC GCG ATG CTC GCG CTC TTT GAG CCG AAG CCG GCG CTC CTC CTC 40  
 Met Arg Gly Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu 10 15  
 GTC GAG CCG CAG CAC CTC GCG TAC GCG ACC TTC CAC GCG CTC AAG GCG 96  
 Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe His Ala Leu Lys Gly 20 25  
 CTC ACC ACC ACC GCG GCG GAG GCG CTC GAG GCG CTC TAC GCG TTC GCG 144  
 Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Glu Ala Val Tyr Gly Phe Ala 35 40 45  
 AAG ACC CTC CTC AAG GCG CTC AAG GAG GAG GCG GAG GCG CTC ATC CTC 192  
 Lys Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Asp Ala Val His Val 50 55 60  
 CTC TTT CAC GCG AAC CCG GCG TCG TTC GCG CAG GAG GCG TAC GCG GCG 240  
 Lys Pro Ala His Arg Glu Lys His Leu Ala His Met Asp Asp Leu Lys 215 230 235 240  
 CTC TCG TCG GAG CTC GCG AAG GTC GCG ACC GAG CTC GCG CTC GAG CTC 788  
 Leu Ser Trp Asp Leu Ala Lys Val Arg Thr Asp Leu Pro Leu Glu Val 245 255  
 CAC TTC GCG AAA ACC GCG GAG CCG GAG CCG GAG ACC CTT ACC GCG TTT 816  
 Asp Phe Ala Lys Arg Arg Glu Pro Asp Arg Glu Arg Leu Arg Ala Phe 260 265 270  
 GTC CAC ACC CTT GAG TTT GCG ACC CTC CTC CAC GAG TTC GCG CTT CTC 864  
 Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly Leu Leu 275 280 285  
 GAA ACC GCG AAG GCG CTC GAG GAG GCG GCG TCG GCG GCG CAA GCG 912  
 Glu Ser Pro Lys Ala Leu Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Glu Gly 290 295 300  
 GCG TTC CTC GCG TTT CTC CTT TCG GCG AAG GAG GCG ATC TCG GCG GAT 960  
 Ala Phe Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Lys Glu Pro Met Trp Ala Asp 305 310 315 320  
 CTT CTC GCG CTC GCG GCG ACC GCG GCG GCG CTC CAC GCG GCG GCG 1008  
 Leu Leu Ala Leu Ala Ala Arg Gly Gly Arg Val His Arg Ala Pro 325 330 335  
 GAG GCT TAT AAA GCG CTC AGG GAG CTC AAG GAG GCG GCG GCG CTT CTC 1056  
 Glu Pro Tyr Lys Ala Leu Arg Asp Leu Lys Glu Ala Arg Gly Leu Leu 340 345 350  
 GCG AAA CAC CTC ACC CTT CTC GCG CTC ACC CAA GCG CTT GCG CTC GCG 1104  
 Ala Lys Asp Leu Ser Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Leu Gly Leu Pro 355 360 365  
 GCG GCG GAG CAG GCG ATG CTC CTC GCG TAC CTC CTC GAG CCG TCG AAC 1152  
 Pro Gly Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro Ser Asn 370 375 380  
 ACC ACC GCG GAG GCG GCG GCG GCG GCG TAC GCG GCG GAG TCG ACC GAG 1200  
 Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp Thr Glu 385 390 395 400

CAG CCG CCG CAG CCG CCC CCG CTT TCG CAG AGG CTC TTC CCG AAC CTG 1240  
 Glu Ala Gly Glu Arg Ala Ala Leu Ser Glu Arg Leu Phe Ala Asn Leu  
 405 410 413  
 TCG CCG AGC CTT CAG CCG CAG CAG AGC CTC CTT TCG CTT TAC CCG CAG 1296  
 Trp Gly Arg Leu Glu Gly Glu Glu Arg Leu Leu Trp Leu Tyr Arg Glu  
 420 423 430  
 CTC CAG AGC CCG CTT TCG CCG CTC CTC CCG CAG ATG CAG CCG AGC CCG 1344  
 Val Glu Arg Pro Leu Ser Ala Val Leu Ala His Met Glu Ala Thr Gly  
 435 440 443  
 CTC CCG CTC CAG CTC CCG TAT CTC AGC CCG TTC TCG CTC CAG CTC CCG 1392  
 Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Arg Ala Leu Ser Leu Glu Val Ala  
 450 453 460  
 CAG CAG ATG CCG CCG CTC CAG CCG CAG CTC TTC CCG CTC CCG CCG CAG 1440  
 Glu Glu Ile Ala Arg Leu Glu Ala Glu Val Phe Arg Leu Ala Gly His  
 465 470 475 480  
 CCG TTC AAC CTC AAC TCG CCG CAG CAG CTC CAA AGC CTC CTC TTT CAG 1488  
 Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Glu Leu Glu Arg Val Leu Phe Asp  
 483 490  
 CAG CTA CCG CTT CCG CCG ATC CCG AAC CAG AAC ACC CCG AAC CCG 1536  
 Glu Leu Gly Leu Pro Ala Ile Gly Lys Thr Glu Lys Thr Gly Lys Arg  
 500 505 510  
 TCG ACC AGC CCG CCG CTC CTC CAG CCG CTC CCG CAG CCG CAG CCG ATC 1584  
 Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His Pro Ile  
 513 520 525  
 CTC CAG AAC ATC CTC CAG TAC CCG CAG CTC ACC AAC CTC AAC AGC AGC 1632  
 Val Glu Lys Ile Leu Glu Tyr Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys Ser Thr  
 530 535 540  
 TAC ATT CAG CCG TTC CCG CAG CTC ATC CAG CCG AGC AGC CCG CCG CTC 1680  
 Tyr Ile Asp Pro Leu Pro Asp Leu Ile His Phe Arg Thr Gly Arg Leu  
 545 550 555 560  
 CAG AGC CCG TTC AAC CAG AGC CCG AGC CCG AGC CCG CTA ACT AGC 1728

Glu Thr Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Glu Ala Arg 725  
 730 735  
 CTC AAC AGC CTC CCG CAG CCG CCG CAG CCG ATG CCG TTC AAC ATG CCG 2256  
 Val Lys Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn Met Pro  
 740 745 750  
 CTC CAG CCG ACC CCG CCG CAG CTC ATG AAC CTC CCG ATG CTC AAC CTC 2304  
 Val Glu Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val Lys Leu  
 755 760 765  
 TTC CCG AGC CTC CAG CAA ATG CCG CCG ACC ATG CTC CTT CAG CTC CAG 2352  
 Phe Pro Arg Leu Glu Glu Met Gly Ala Arg Met Leu Leu Glu Val His  
 770 775 780  
 CAG CAG CTC CTC CTC CAG CCG CCA AAA CAG AGC CCG CAG CCG CTC CCG 2400  
 Asp Glu Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ala Val Ala  
 785 790 795 800  
 CCG CTC CCG AAC CAG CTC ATC CAG CCG CTC TAT CCG CTC CCG CTC CCG 2448  
 Arg Leu Ala Lys Glu Val Met Glu Gly Val Tyr Pro Leu Ala Val Pro  
 805 810 815  
 CTC CAG CTC CAG CTC CCG ATA CCG CAG CAG TCG CTC TCG CCG AAC CAG 2496  
 Leu Glu Val Glu Val Gly Ile Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala Lys Glu  
 820 825 830

TGA

(2) 配列番号: 2:

(1) 配列の特徴:

(A) 長さ: 832 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(II) 分子の型: 蛋白質

(x1) 配列の配位: 配列番号: 2:

His Thr Arg Phe Asn Glu Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser 363  
 370 375  
 TCG CAT CCG AAC CTC CAG AAC ATC CCG CTC CCG ACC CCG CTT CCG CAG 1776  
 Ser Asp Pro Asn Leu Glu Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu Gly Glu  
 380 385 390  
 AGC ATC CCG CCG CCG TTC ATC CCG CAG CAG CCG TCG CTA TTC CTC CCG 1824  
 Arg Ile Arg Arg Ala Phe Ile Ala Glu Glu Gly Trp Leu Leu Val Ala  
 395 400 405  
 CTC CAG TAT AGC CAG ATA CAG CTC AGC CTC CTC CCG CAG CTC TCG CCG 1872  
 Leu Asp Tyr Ser Glu Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser Gly  
 410 415 420  
 CAG CAG AAC CTC ATC CCG CTC TTC CAG CAG CCG CCG CAG ATC CAG ACC 1920  
 Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Glu Glu Gly Arg Asp Ile His Thr  
 425 430 435 440  
 CAG ACC CCG AGC TCG ATC TTC CCG CTC CCG CCG CAG CCG CTC CAG CCG 1968  
 Glu Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Phe Arg Glu Ala Val Asp Pro  
 445 450 455  
 CTC ATC CCG CCG CCG CCG AAC ACC ATC AAC TTC CCG CTC CTC TAC CCG 2016  
 Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Ile Asn Phe Gly Val Leu Tyr Gly  
 460 465 470  
 ATG TCG CCG CAG CCG CTC TCG CAG CAG CTA CCG ATC CCG TAC CAG CAG 2064  
 Met Ser Ala His Arg Leu Ser Glu Leu Ala Ile Pro Tyr Glu Glu  
 475 480 485  
 CCG CAG CCG TTC ATT CAG CCG TAC TTT CAG ACC TTC CCG AAC CTC CCG 2112  
 Ala Glu Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Glu Ser Phe Phe Lys Val Arg  
 490 495 500  
 CCG TCG ATT CAG AAC ACC CTC CAG CAG CCG ACC ACC CCG CCG TAC CTC 2160  
 Ala Trp Ile Glu Lys Thr Leu Glu Glu Gly Arg Arg Arg Gly Tyr Val  
 505 510 515 520  
 CAG ACC CTC TTC CCG CCG CCG CCG TAC CTC CCA CAG CTA CAG CCG CCG 2200

Met Arg Gly Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu 1  
 5 10 15  
 Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe His Ala Leu Lys Gly 20  
 25 30  
 Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Glu Ala Val Tyr Gly Phe Ala 35  
 40 45  
 Lys Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Asp Ala Val Ile Val 50  
 55 60  
 Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Gly Gly 65  
 70 75 80  
 Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Glu Leu 85  
 90 95  
 Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Leu Ala Arg Leu Glu 100  
 105 110  
 Val Pro Gly Tyr Glu Ala Asp Val Leu Ala Ser Leu Ala Lys Lys 115  
 120 125  
 Ala Glu Lys Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Lys Asp 130  
 135 140  
 Leu Tyr Glu Leu Leu Ser Asp Arg Ile His Val Leu His Pro Glu Gly 145  
 150 155 160  
 Tyr Leu Ile Thr Pro Ala Trp Leu Trp Glu Lys Tyr Gly Leu Arg Pro 165  
 170 175  
 Asp Glu Trp Ala Asp Tyr Arg Ala Leu Thr Gly Asp Glu Ser Asp Asn 180  
 185 190  
 Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Arg Lys Leu Leu 195  
 200 205  
 Glu Glu Trp Gly Ser Leu Glu Ala Leu Leu Lys Asn Leu Asp Arg Leu 210  
 215 220  
 Lys Pro Ala Ile Arg Glu Lys Ile Leu Ala His Met Asp Asp Leu Lys 225  
 230 235 240  
 Leu Ser Trp Asp Leu Ala Lys Val Arg Thr Asp Leu Pro Leu Glu Val 245  
 250 255  
 Asp Phe Ala Lys Arg Arg Glu Pro Asp Arg Glu Arg Leu Arg Ala Phe 260  
 265 270

Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly Leu Leu  
 275 200 303  
 Glu Ser Pro Lys Ala Leu Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro Glu Gly  
 290 293 300  
 Ala Phe Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Lys Glu Pro Met Trp Ala Asp  
 303 310 313 320  
 Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ala Arg Gly Gly Arg Val His Arg Ala Pro  
 323 330 333  
 Glu Pro Tyr Lys Ala Leu Arg Asp Leu Lys Glu Ala Arg Gly Leu Leu  
 340 343 350  
 Ala Lys Asp Leu Ser Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Leu Gly Leu Pro  
 353 360 363  
 Pro Gly Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro Ser Asp  
 370 373 380  
 Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Trp Thr Glu  
 383 390 393 400  
 Glu Ala Gly Glu Arg Ala Ala Leu Ser Glu Arg Leu Phe Ala Asp Leu  
 403 410 413  
 Trp Gly Arg Leu Glu Gly Glu Glu Arg Leu Leu Trp Leu Tyr Arg Glu  
 420 423 430  
 Val Glu Arg Pro Leu Ser Ala Val Leu Ala His Met Glu Ala Thr Gly  
 433 440 443  
 Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Arg Ala Leu Ser Leu Glu Val Ala  
 450 453 460  
 Glu Glu Ile Ala Arg Leu Glu Ala Glu Val Phe Arg Leu Ala Gly His  
 463 470 473 480  
 Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Glu Leu Glu Arg Val Leu Phe Asp  
 483 490 493  
 Glu Leu Gly Leu Pro Ala Ile Gly Lys Thr Glu Lys Thr Gly Lys Arg  
 500 503 510  
 Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His Pro Ile  
 513 520 523  
 Val Glu Lys Ile Leu Glu Tyr Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys Ser Thr  
 530 533 540

Tyr Ile Asp Pro Leu Pro Asp Leu Ile His Pro Arg Thr Gly Arg Leu  
 343 350 353 360  
 His Thr Arg Phe Asn Glu Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser  
 363 370 373  
 Ser Asp Pro Asn Leu Glu Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu Gly Gly  
 380 383 390  
 Arg Ile Arg Arg Ala Phe Ile Ala Glu Glu Gly Trp Leu Leu Val Ala  
 393 400 403  
 Leu Asp Tyr Ser Glu Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser Gly  
 410 413 420  
 Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Glu Glu Gly Arg Asp Ile His Thr  
 423 430 433 440  
 Glu Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Pro Arg Glu Ala Val Asp Pro  
 443 450 453  
 Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Ile Asn Phe Gly Val Leu Tyr Gly  
 460 463 470  
 Met Ser Ala His Arg Leu Ser Glu Glu Leu Ala Ile Pro Tyr Glu Glu  
 473 480 483  
 Ala Glu Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Glu Ser Phe Pro Lys Val Arg  
 490 493 500  
 Ala Trp Ile Glu Lys Thr Leu Glu Glu Gly Arg Arg Gly Tyr Val  
 503 510 513 520  
 Glu Thr Leu Phe Gly Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Glu Ala Arg  
 523 530 533 540  
 Val Lys Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn Met Pro  
 543 550 553  
 Val Glu Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val Lys Leu  
 553 560 563  
 Phe Pro Arg Leu Glu Glu Met Gly Ala Arg Met Leu Leu Glu Val His  
 570 573 580  
 Asp Glu Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ala Val Ala  
 583 590 593 600  
 Arg Leu Ala Lys Glu Val Met Glu Gly Val Tyr Pro Leu Ala Val Pro  
 603 610 613  
 Leu Glu Val Glu Val Gly Ile Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala Lys Glu  
 620 623 630

(2) 配列番号: 3:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 2682 塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直線状

(E) 分子の型: DNA (genomic)

(F) ハイボセティカル: 80

(G) アンチセンス: 00

(H) 由来:

(A) 生物: *Theropithecus aethiopicus*

(I) 特徴:

(A) DBE/REY: CDS

(B) 位置: 1..2679

(ii) 配列の記号: 配列番号: 3:

ATG GCG ACA CTA TTT CTC TTT GAT GCA ACT GGT CTC GCG TAC ACA GCG 44  
 Met Ala Arg Leu Phe Leu Phe Asp Gly Thr Ala Leu Ala Tyr Arg Ala 13  
 TAC TAT CCG CTC CAT ACA TCG CTT TCT ACT TCC ACG GCG ATT GCG ACA 96  
 Tyr Tyr Ala Leu Asp Arg Ser Leu Ser Thr Ser Thr Gly Ile Pro Thr 20  
 AAC GCG ACA TAC CCT CTC GCG ACG ATC CTC GTG ACA TTC ATC AAA CAC 144  
 Asn Ala Thr Tyr Gly Val Ala Arg Met Leu Val Arg Phe Ile Lys Asp 43  
 CAT ATC ATT CTC GCA AAA CAC TAC CTT GCT CTC GCT TTC GAC AAA AAA 192  
 His Ile Ile Val Gly Lys Asp Tyr Val Ala Val Ala Phe Asp Lys Lys 33  
 GGT GCG ACG TTC ACA CAC AAC CTC CTC GAG ACT TAC AAG CCT CAA ACA 240

Ala Ala Thr Phe Arg His Lys Leu Leu Glu Thr Tyr Lys Ala Glu Arg 85  
 CCA AAG ACT CCG GAT CTC CTC ATT CAC CAC CTT CCG TAC ATA AAC AAG 208  
 Pro Lys Thr Pro Asp Leu Leu Ile Glu Glu Leu Pro Tyr Ile Lys Lys 43  
 CTC CTC GAA CCC CTT GCA ATC AAA CTC CTC CAC CTA CAA CCA TAC CAA 336  
 Leu Val Glu Ala Leu Gly Met Lys Val Leu Glu Val Glu Gly Tyr Glu 100  
 GCG CAC CAT ATA ATT CCG ACT CTC GGT CTC AAC CCG CTT CCG CTT TTT 384  
 Ala Asp Asp Ile Ile Ala Thr Leu Ala Val Lys Gly Leu Pro Leu Phe 113  
 GAT GAA ATA TTC ATA CTC ACC GCA GAT AAA CAC ATC CTT CAC CTT CTC 432  
 Asp Glu Ile Phe Ile Val Thr Gly Asp Lys Asp Met Leu Glu Leu Val 130  
 AAC GAA AAC ATC AAC CTC TCG CCA ATC CTA AAA CCG ATA TCC CAT CTC 480  
 Asn Glu Lys Ile Lys Val Trp Arg Ile Val Lys Gly Ile Ser Asp Leu 143  
 GAA CTT TAC GAT CCG CAC AAG CTC AAC GAA AAA TAC GGT GTT GAA CCG 520  
 Glu Leu Tyr Asp Ala Glu Lys Val Lys Glu Lys Tyr Gly Val Glu Pro 163  
 CAC CAC ATC CCG GAT CTT CTC CTT CTA ACC GCA GAT CAA ATA CAC AAC 576  
 Glu Glu Ile Pro Asp Leu Leu Ala Leu Thr Gly Asp Glu Ile Asp Asn 180  
 ATC CCG CTT CTA ACT CCG ATA GGT GAA AAG ACT CTT CTT CAC CTT CTA 624  
 Ile Pro Gly Val Thr Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Val Glu Leu Leu 193  
 CAC AAC TAC AAA CAC CTC GAA CAC ATA CTC AAT CAT GTT CCG GAA CTT 672  
 Glu Lys Tyr Lys Asp Leu Glu Asp Ile Leu Asn His Val Arg Glu Leu 210  
 CCT CAC AAC CTC ACA AAA CCG CTC CTT CCA CAC ACA GAA AAC CCG ATT 720  
 Pro Glu Lys Val Arg Lys Ala Leu Leu Arg Asp Arg Glu Asn Ala Ile 223

CTC ACC AAA AAC CTC GGC ATT CTC CAA ACA AAC GTT CCC ATT CAA ATA 760  
 Leu Ser Lys Lys Leu Ala Ile Leu Glu Thr Asn Val Pro Ile Glu Ile 345 250 355  
 AAC TGC GAA GAA GTT CCC TAG CAG GGC TAG GAC ACA CAG AAA CTC TTA 016  
 Asn Trp Glu Glu Leu Arg Tyr Glu Gly Tyr Asp Arg Glu Lys Leu Leu 260 265 270  
 CCA GTT TTG AAA GAA CTC GAA TTC GCA TCC ATC ATC AAC GAA CTT CAA 164  
 Pro Leu Leu Lys Glu Leu Glu Phe Ala Ser Ile Met Lys Glu Leu Glu 275 280 285  
 CTG TAC GAA CAG TCC GAA CCC GTT CCA TAG ACA ATA GTC AAA GAC CTA 912  
 Leu Tyr Glu Glu Ser Glu Pro Val Gly Tyr Arg Ile Val Lys Asp Leu 290 295 300  
 CTG GAA TTT CAA AAA CTC ATA CAG AAA CTC ACA GAA TCC CCT TCC TTC 960  
 Val Glu Phe Glu Lys Leu Ile Glu Lys Leu Arg Glu Ser Pro Ser Phe 305 310 315 320  
 GGC ATA CAT CTT CAG AGC TCT TCC CTC CAT CTT TTC CAC TCC CAC ATT 1000  
 Ala Ile Asp Leu Glu Thr Ser Ser Leu Asp Pro Phe Asp Cys Asp Ile 315 320 325  
 GTC GGT ATC TGT GTC TCT TTC AAA CCA AAC CAA GCG TAC TAC ATA CCA 1056  
 Val Gly Ile Ser Val Ser Phe Lys Pro Lys Glu Ala Tyr Tyr Ile Pro 325 330 335  
 CTC CAT CAT ACA AAC GGC CAG AAC CTG CAG GAA AAA CAC GTT CTC AAA 1104  
 Leu His Ile Arg Asn Ala Glu Asn Leu Asp Glu Lys Glu Val Leu Lys 335 340 345  
 AAC CTC AAA GAA ATT CTG CAG CAC CCC CCA CCA AAC ATC GTT CCT CAG 1152  
 Lys Leu Lys Glu Ile Leu Glu Asp Pro Gly Ala Lys Ile Val Gly Glu 350 355 360  
 AAT TTC AAA TTC CAT TAC AAC GTC TTG ATC GTC AAC CTT GTT GAA CCT 1200  
 Asn Leu Lys Phe Asp Tyr Lys Val Leu Met Val Lys Gly Val Glu Pro 365 370 375 380  
 GTT CCT CCT TAC TTC CAG AGC ATG ATA GCG CCT TAC CTT CTT CAG CCC 1248

Gly Ile Lys Pro Arg Gly Lys Thr Thr Lys Thr Gly Asp Tyr Ser Thr 385 390 395  
 CCC ATA GAA CTC CTC CAG CAA GTT CCC GGT CAA CAC GAA ATC ATT CCT 1776  
 Arg Ile Glu Val Leu Glu Glu Leu Ala Gly Glu His Glu Ile Ile Pro 395 400 405  
 CTC ATT CTT CAA TAC ACA AAC ATA CAG AAA TTG AAA TCA ACC TAC ATA 1824  
 Leu Ile Leu Glu Tyr Arg Lys Ile Glu Lys Leu Lys Ser Thr Tyr Ile 395 400 405  
 CAC GCT CTT CCC AAC ATC GTC AAC CCA AAC ACC CCA AGC ATT CAT GCT 1872  
 Asp Ala Leu Pro Lys Met Val Asn Pro Lys Thr Gly Arg Ile His Ala 410 415 420  
 TCT TTC AAT CAA AGC GGC ACT GCG ACT CCA ACA CTT AGC AGC AGC GAT 1920  
 Ser Phe Asn Glu Thr Gly Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser Ser Asp 425 430 435 440  
 CCC AAT CTT CAG AAC CTC GCG AGC AAA AGT CAA CAG CCA AAA GAA ATC 1968  
 Pro Asn Leu Glu Asn Leu Pro Thr Lys Ser Glu Glu Gly Lys Glu Ile 445 450 455  
 AGC AAA GGC ATA GTT CCT CAG CAT CCA AAC TGC TGC ATC GTC AGT GCG 2016  
 Arg Lys Ala Ile Val Pro Glu Asp Pro Asn Trp Trp Ile Val Ser Ala 460 465 470  
 CAC TAC TCC CAA ATA CAA CTC ACC ATC CTC CCC CAT CTC ACT GGT GAT 2064  
 Asp Tyr Ser Glu Ile Glu Leu Arg Ile Leu Ala His Leu Ser Gly Asp 475 480 485  
 CAC AAT CTT TTG AGC CCA TTC GAA CAG CCC ATC CAG GTC CAG ACT CTA 2112  
 Glu Asn Leu Leu Arg Ala Phe Glu Glu Gly Ile Asp Val His Thr Leu 490 495 500  
 ACA GCT TCC ACA ATA TTC AAC GTC AAA CCC GAA CAA GTA ACC GAA GAA 2160  
 Thr Ala Ser Arg Ile Phe Asn Val Lys Pro Gly Glu Val Thr Glu Glu 505 510 515  
 ATC GCG GCG CCT CCT AAA ATC CTT AAT TTT TCC ATC ATA TAC GGT CTA 2208

Val Pro Pro Tyr Phe Asp Thr Met Ile Ala Ala Tyr Leu Leu Glu Pro 405 410 415  
 AAC CAA AAC AAC TTC AAT CTC GAC GAT CTC GCA TTC AAA TTT CTT CCA 1296  
 Asn Glu Lys Lys Phe Asn Leu Asp Asp Leu Ala Leu Lys Phe Leu Gly 420 425 430  
 TAC AAA ATC ACA TCT TAC CAA CAG CTC ATC TCC TTC TCT TTT CCG CTC 1344  
 Tyr Lys Met Thr Ser Tyr Glu Glu Leu Met Ser Phe Ser Phe Pro Leu 435 440 445  
 TTT GGT TTC AGT TTT CCG CAT CTT CCT CTA CAA AAA CCA CCG AAC TAC 1392  
 Phe Gly Phe Ser Phe Ala Asp Val Pro Val Glu Lys Ala Ala Asn Tyr 450 455 460  
 TGC TGT GAA CAT CCA CAG ATC ACC TAC ACA CTT TAC AAG ACC CTG AGC 1440  
 Ser Cys Glu Asp Ala Asp Ile Thr Tyr Arg Leu Tyr Lys Thr Leu Ser 465 470 475 480  
 TTA AAA CTC CAG CAG CCA CAT CTC GAA AAC GTC TTC TAC AAC ATA CAA 1488  
 Leu Lys Leu His Glu Ala Asp Leu Glu Asn Val Phe Tyr Lys Ile Glu 485 490 495  
 ATG CCC GTT GTC AAC GTC GTT CCA CCG ATC GAA CTC AAC GGT GTC TAT 1536  
 Met Pro Leu Val Asn Val Leu Ala Arg Met Glu Leu Asn Gly Val Tyr 500 505 510  
 GTC CAC ACA GAG TTC CTC AAG AAA CTC TCA CAA CAG TAC CCA AAA AAA 1584  
 Val Asp Thr Glu Phe Leu Lys Lys Leu Ser Glu Glu Tyr Gly Lys Lys 515 520 525  
 CTC GAA GAA CTG CCA CAG GAA ATA TAC ACC ATA GGT CCA CAG CCG TTC 1632  
 Leu Glu Glu Leu Ala Glu Glu Ile Tyr Arg Ile Ala Gly Glu Pro Phe 530 535 540  
 AAC ATA AAC TCA CCG AAG CAG GTT TCA ACC ATC GTT TTT GAA AAA CTC 1680  
 Asn Ile Asn Ser Pro Lys Glu Val Ser Arg Ile Leu Phe Glu Lys Leu 545 550 555 560  
 GCG ATA AAA CCA CGT GGT AAA ACC ACC AAA ACC CCA CAC TAT TCA ACA 1728

Met Arg Arg Ala Gly Lys Met Val Asn Phe Ser Ile Ile Tyr Gly Val 725 730 735  
 ACA CCT TAC GGT CTC TCT CTC ACC GTT CCA GTA GGT CTC AAA GAA CCA 2256  
 Thr Pro Tyr Gly Leu Ser Val Arg Leu Gly Val Pro Val Lys Glu Ala 740 745 750  
 GAA AAG ATC ATC CTC AAC TAC TTC CTC CTC TAC CCA AAG GTC CCG GAT 2304  
 Glu Lys Met Ile Val Asn Tyr Phe Val Leu Tyr Pro Lys Val Arg Asp 755 760 765  
 TAC ATT CAG AGC GTC CTA TCG GAA CCG AAA CAA AAA CCG TAT GTT AGA 2352  
 Tyr Ile Glu Arg Val Val Ser Glu Ala Lys Glu Lys Gly Tyr Val Arg 770 775 780  
 AGC CTC TTT CCA ACA AAA ACA CAC ATA CCA CAG CTC ATC GCG CTG CAC 2400  
 Thr Leu Phe Gly Arg Lys Arg Asp Ile Pro Glu Leu Met Ala Arg Asp 785 790 795 800  
 AGC AAC ACA CAG CCT CAA CCA GAA CCA ATT GCG ATA AAC ACT CCC ATA 2448  
 Arg Asn Thr Glu Ala Glu Gly Glu Arg Ile Ala Ile Asn Thr Pro Ile 805 810 815  
 CAG GCT ACA CCA CCG GAT ATA ATA AAC CTC GGT ATC ATA CAA ATA CAG 2496  
 Glu Gly Thr Ala Ala Asp Ile Ile Lys Leu Ala Met Ile Glu Ile Asp 820 825 830  
 AGC GAA CTC AAA GAA ACA AAA ATC ACA TGC AAG ATG ATC ATA CAG GTC 2544  
 Arg Glu Leu Lys Glu Arg Lys Met Arg Ser Lys Met Ile Ile Glu Val 835 840 845  
 CAC CAC GAA CTG GTT TTT GAA GTC CCC AAT CAG GAA AAC CAG CCG CTC 2592  
 His Asp Glu Leu Val Phe Glu Val Pro Asn Glu Glu Lys Asp Ala Leu 850 855 860  
 CTC CAG CTG CTC AAA CAC ACA ATG ACC AAT CTC CTA AAC CTT TCA CTC 2640  
 Val Glu Leu Val Lys Asp Arg Met Thr Asn Val Val Lys Leu Ser Val 865 870 875 880  
 CCG CTC GAA GTC CAT CTA ACC ATC CCG AAA ACA TGC TCG TCA 2688  
 Pro Leu Glu Val Asp Val Thr Ile Gly Lys Thr Trp Ser 885 890

(2) 配列番号: 4:

(1) 配列の特徴:

(A) 長さ: 893 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直線状

(II) 分子の型: 蛋白質

(a1) 配列の記述: 配列番号: 4:

Met Ala Arg Leu Phe Leu Phe Asp Gly Thr Ala Leu Ala Tyr Arg Ala  
1 5 10 15  
Tyr Tyr Ala Leu Asp Arg Ser Leu Ser Thr Ser Thr Gly Ile Pro Thr  
20 25 30  
Asn Ala Thr Tyr Gly Val Ala Arg Met Leu Val Arg Phe Ile Lys Asp  
35 40 45  
His Ile Ile Val Gly Lys Asp Tyr Val Ala Val Ala Phe Asp Lys Lys  
50 55 60  
Ala Ala Thr Phe Arg His Lys Leu Leu Glu Thr Tyr Lys Ala Gln Arg  
65 70 75 80  
Pro Lys Thr Pro Asp Leu Leu Ile Gln Gln Leu Pro Tyr Ile Lys Lys  
85 90 95  
Leu Val Glu Ala Leu Gly Met Lys Val Leu Glu Val Glu Gly Tyr Glu  
100 105 110  
Ala Asp Asp Ile Ile Ala Thr Leu Ala Val Lys Gly Leu Pro Leu Phe  
115 120 125  
Asp Glu Ile Phe Ile Val Thr Gly Asp Lys Asp Met Leu Gln Leu Val  
130 135 140  
Asn Glu Lys Ile Lys Val Thr Arg Ile Val Lys Gly Ile Ser Asp Leu  
145 150 155  
Glu Leu Tyr Asp Ala Gln Lys Val Lys Glu Lys Tyr Gly Val Glu Pro  
160 165 170 175  
Gln Gln Ile Pro Asp Leu Leu Ala Leu Thr Gly Asp Glu Ile Asp Asn  
180 185 190  
Ile Pro Gly Val Thr Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Val Gln Leu Leu  
195 200 205

Leu Lys Leu His Glu Ala Asp Leu Glu Asn Val Phe Tyr Lys Ile Glu  
485 490 495  
Met Pro Leu Val Asn Val Leu Ala Arg Met Glu Leu Asn Gly Val Tyr  
500 505 510  
Val Asp Thr Glu Phe Leu Lys Lys Leu Ser Glu Glu Tyr Gly Lys Lys  
515 520 525  
Leu Glu Glu Leu Ala Glu Glu Ile Tyr Arg Ile Ala Gly Glu Pro Phe  
530 535 540  
Asn Ile Asn Ser Pro Lys Gln Val Ser Arg Ile Leu Phe Glu Lys Leu  
545 550 555  
Gly Ile Lys Pro Arg Gly Lys Thr Thr Lys Thr Gly Asp Tyr Ser Thr  
560 565 570  
Arg Ile Glu Val Leu Glu Glu Leu Ala Gly Glu His Glu Ile Ile Pro  
575 580 585  
Leu Ile Leu Glu Tyr Arg Lys Ile Gln Lys Leu Lys Ser Thr Tyr Ile  
590 595 600 605  
Asp Ala Leu Pro Lys Met Val Asn Pro Lys Thr Gly Arg Ile His Ala  
610 615 620  
Ser Phe Asn Gln Thr Gly Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser Ser Asp  
625 630 635 640  
Pro Asn Leu Gln Asn Leu Pro Thr Lys Ser Glu Glu Gly Lys Glu Ile  
645 650 655  
Arg Lys Ala Ile Val Pro Gln Asp Pro Asn Trp Trp Ile Val Ser Ala  
660 665 670  
Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Ile Leu Ala His Leu Ser Gly Asp  
675 680 685  
Glu Asn Leu Leu Arg Ala Phe Glu Glu Gly Ile Asp Val His Thr Leu  
690 695 700  
Thr Ala Ser Arg Ile Phe Asn Val Lys Pro Glu Glu Val Thr Glu Glu  
705 710 715  
Met Arg Arg Ala Gly Lys Met Val Asn Phe Ser Ile Ile Tyr Gly Val  
720 725 730  
Thr Pro Tyr Gly Leu Ser Val Arg Leu Gly Val Pro Val Lys Glu Ala  
735 740 745 750

Glu Lys Tyr Lys Asp Leu Glu Asp Ile Leu Asn His Val Arg Glu Leu  
110 115 120  
Pro Gln Lys Val Arg Lys Ala Leu Leu Arg Asp Arg Glu Asn Ala Ile  
125 130 135  
Leu Ser Lys Lys Leu Ala Ile Leu Glu Thr Asn Val Pro Ile Glu Ile  
140 145 150  
Asn Trp Glu Glu Leu Arg Tyr Gln Gly Tyr Asp Arg Glu Lys Leu Leu  
155 160 165  
Pro Leu Leu Lys Glu Leu Glu Phe Ala Ser Ile Met Lys Glu Leu Gln  
170 175 180  
Leu Tyr Glu Glu Ser Glu Pro Val Gly Tyr Arg Ile Val Lys Asp Leu  
185 190 195  
Val Glu Phe Glu Lys Leu Ile Glu Lys Leu Arg Glu Ser Pro Ser Phe  
200 205 210  
Ala Ile Asp Leu Glu Thr Ser Ser Leu Asp Pro Phe Asp Cys Asp Ile  
215 220 225  
Val Gly Ile Ser Val Ser Phe Lys Pro Lys Glu Ala Tyr Tyr Ile Pro  
230 235 240  
Leu His His Arg Asn Ala Gln Asn Leu Asp Glu Lys Glu Val Leu Lys  
245 250 255  
Lys Leu Lys Glu Ile Leu Glu Asp Pro Gly Ala Lys Ile Val Gly Gln  
260 265 270  
Asn Leu Lys Phe Asp Tyr Lys Val Leu Met Val Lys Gly Val Glu Pro  
275 280 285  
Val Pro Pro Tyr Phe Asp Thr Met Ile Ala Ala Tyr Leu Leu Glu Pro  
290 295 300  
Asn Glu Lys Lys Phe Asn Leu Asp Asp Leu Ala Leu Lys Phe Leu Gly  
305 310 315  
Tyr Lys Met Thr Ser Tyr Gln Glu Leu Met Ser Phe Ser Phe Leu  
320 325 330  
Phe Gly Phe Ser Phe Ala Asp Val Pro Val Glu Lys Ala Ala Asn Tyr  
335 340 345  
Ser Cys Glu Asp Ala Asp Ile Thr Tyr Arg Leu Tyr Lys Thr Leu Ser  
350 355 360

Glu Lys Met Ile Val Asn Tyr Phe Val Leu Tyr Pro Lys Val Arg Asp  
755 760 765  
Tyr Ile Gln Arg Val Val Ser Glu Ala Lys Glu Lys Gly Tyr Val Arg  
770 775 780  
Thr Leu Phe Gly Arg Lys Arg Asp Ile Pro Gln Leu Met Ala Arg Asp  
785 790 795  
Arg Asn Thr Gln Ala Glu Gly Glu Arg Ile Ala Ile Asn Thr Pro Ile  
800 805 810  
Gln Gly Thr Ala Ala Asp Ile Ile Lys Leu Ala Met Ile Glu Ile Asp  
815 820 825  
Arg Glu Leu Lys Glu Arg Lys Met Arg Ser Lys Met Ile Ile Gln Val  
830 835 840  
His Asp Glu Leu Val Phe Glu Val Pro Asn Glu Glu Lys Asp Ala Leu  
845 850 855  
Val Glu Leu Val Lys Asp Arg Met Thr Asn Val Val Lys Leu Ser Val  
860 865 870  
Pro Leu Glu Val Asp Val Thr Ile Gly Lys Thr Thr Ser  
875 880 885

(2) 配列番号: 5:

(1) 配列の特徴:

(A) 長さ: 2493 塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 口の域: 一本鎖

(D) トポロジー: 直線状

(II) 分子の型: DNA (genomic)

(E) ハイボセティカル: 80

(F) アンチセンス: 80

(vi) 由来:

(A) 生物: *Thordax species sp17*

(E) 特徴:

(A) DARR/DB: GDS

(B) 位元: 1..2490

(a1) 序列 位置: 序列号: 5:

ATC CTC GGC CTC TTT GAG CCC AAG GGC GGC CTC CTC CTC CTC GAC GGC 40  
 Hae Lou Pro Lou Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Lou Lou Val Asp Gly  
 1 5 10 15  
 CAC CAC GTG GGC TAC GGC ACC TTT TTC GGC CTC AAG GGC CTC ACC ACC 96  
 His His Lou Ala Tyr Arg Thr Phe Ala Lou Lys Gly Lou Thr Thr  
 20 25 30  
 AAG GGC GGC GAG CCC CTC CAG GGC GTT TAT GGC TTC GGC AAA ACC CTC 144  
 Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala Lys Ser Lou  
 35 40 45  
 CTC AAG GGC CTC AAG GAG GAT GGC GAG CTC GGC ATC CTC CTC TTT CAC 192  
 Lou Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Glu Val Ala Ile Val Val Phe Asp  
 50 55 60  
 GGC AAG GGC GGC TGC TTC GGC CAC GAG GGC TAC GAG GGC TAC AAG GGC 240  
 Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Glu Ala Tyr Lys Ala  
 65 70 75 80  
 GGC GGC GGC GGC ACC GGC GAG CAC TTT GGC GGC CAG CTC GGC CTC ATC 288  
 Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln Lou Ala Lou Ile  
 85 90 95  
 AAG CAC GTG CTC CAC CTT TTC GGC CTC CTC GGC CTT CAG CTC GGC GGC 336  
 Lys Glu Lou Val Asp Lou Lou Gly Lou Val Arg Lou Glu Val Pro Gly  
 100 105 110  
 TTT CAC GGC CAC GAT CTC CTC GGC ACC CTC GGC AAG AAG GCA CAA ACC 384  
 Phe Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Thr Leu Ala Lys Lys Ala Glu Arg  
 115 120 125  
 CAG GGC TAC CAG CTC GGC ATC CTC ACC GGC CAC GGC CAC CTC TAC CAC 432  
 Glu Gly Tyr Glu Val Arg His Leu Ser Ala Asp Arg Asp Lou Tyr Gln  
 130 135 140  
 CTC CTT TCC CAC GGC ATC CAC CTC CTC CAC GGC CAG GGC GAG CTC CTC 480  
 Leu Leu Ser Asp Arg His His Leu Lou His Pro Glu Gly Glu Val Leu  
 145 150 155 160  
 Ala Leu Ala Gly Ala Lys Glu Gly Arg Val His Arg Ala Glu Asp Pro 1056  
 325 330 335  
 CTC GGC GGC CTA AAG CAC CTC AAG CAG ATC GGC GGC CTC CTC GGC AAG 1104  
 Val Gly Ala Lou Lys Asp Leu Lys Glu Ile Arg Gly Lou Leu Ala Lys  
 340 345 350  
 CAC CTC TGC CTC CTC GGC CTC ACC CAG GGC GGC CAG ATC GGC GGC GGC 1152  
 Asp Lou Ser Val Lou Ala Lou Arg Glu Gly Arg Glu Ile Pro Pro Gly  
 355 360 365  
 CAC CAC GGC ATC CTC CTC GGC TAC CTC CTC GAG GGC GGC AAG ACC AAC 1200  
 Asp Asp Pro Met Lou Lou Ala Tyr Leu Leu Asp Pro Gly Asn Thr Asn  
 370 375 380  
 GGC CAC GGC CTC GGC GGC GGC TAC GGC GGC GAG TCG AAG CAG CAC GGC 1248  
 Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp Lys Glu Asp Ala  
 385 390 395 400  
 GGC GGC GGC GGC CTC CTT TCG GAA ACC CTC TCG CAG GGC CTT TAC GGC 1296  
 Ala Ala Arg Ala Lou Lou Ser Glu Arg Leu Trp Gln Ala Leu Tyr Pro  
 405 410 415  
 GGC CTC GGC CAG CAG GAA ACC CTC CTT TCG CTC TAC GGC CAG CTC CAG 1344  
 Arg Val Ala Glu Glu Arg Leu Leu Trp Leu Tyr Arg Glu Val Glu  
 420 425 430  
 GGC GGC CTC GGC CAG CTC CTC GGC CAG ATC CAG GGC AAG GGC CTC GGC 1392  
 Arg Pro Lou Ala Gln Val Lou Ala His Met Glu Ala Thr Gly Val Arg  
 435 440 445  
 CTC GAT CTC GGC TAC CTC CAG GGC CTT TCG CAG CAG CTC GGC TTT CAG 1440  
 Lou Asp Val Pro Tyr Lou Glu Ala Lou Ser Gln Glu Val Ala Phe Glu  
 450 455 460  
 CTC CAG GGC CTC CAG GGC CAG CTC CAG GGC CTC GGC GGC CAG GGC TTC 1488  
 Lou Glu Arg Lou Glu Ala Glu Val His Arg Leu Ala Gly His Pro Phe  
 465 470 475 480

ACC GGC GGC TCG CTC CAG CAG GGC TAC GGC CTC TCG GGC CAG ACC TCG 320  
 Thr Pro Gly Trp Lou Gln Glu Arg Tyr Gly Leu Ser Pro Glu Arg Trp  
 165 170 175  
 GTC GAG TAC GGC GGC CTC CTC GGC CAG CCG TCG GAG AAG CTC GGC GGC 376  
 Val Glu Tyr Arg Ala Lou Val Gly Asp Pro Ser Asp Asn Lou Pro Gly  
 180 185 190  
 GTC GGC GGC ATC GGC CAG AAG ACC GGC CTC AAG CTC CTC AAG CAG TCG 424  
 Val Pro Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Lou Lys Leu Lys Glu Trp  
 195 200 205  
 GGT ACC CTC GAA GGC ATT CTA AAG AAC CTC CAG CAG CTC AAG GGC GAA 472  
 Gly Ser Lou Glu Ala Ile Leu Lys Asn Lou Asp Gln Val Lys Pro Glu  
 210 215 220  
 AAG GTC GGC GAG GGC ATC GGC AAT AAC CTC CAT AAG CTC CAG ATC TCG 520  
 Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Asn Asn Lou Asp Lys Lou Gln Met Ser  
 225 230 235 240  
 CTC GAG CTT TCG GGC CTC GGC ACC CAG CTC GGC CTC CAG CTC TTC 568  
 Leu Glu Leu Ser Arg Leu Arg Thr Asp Lou Pro Leu Glu Val Asp Phe  
 245 250 255  
 GGC AAG AGG GGC GAG GGC CAG TCG CAG GGC CTT AAG GGC TTT TCG GAG 616  
 Ala Lys Arg Arg Glu Pro Asp Trp Glu Gly Leu Lys Ala Phe Leu Glu  
 260 265 270  
 GGC CTT CAG TTC GGA ACC CTC CTC CAG CAG TGC GGC CTT CTC CAG GGC 664  
 Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly Leu Leu Glu Ala  
 275 280 285  
 GGC AAG CAG GGC CAG CAG GGC GGC TCG GGC GGC CCG GGC TTT 712  
 Pro Lys Glu Ala Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro Gly Gly Ala Phe  
 290 295 300  
 TTC GGC TTC CTC CTC TCG GGC GGC CAG GGC ATC TCG GGC CAG CTT TTC 760  
 Leu Gly Phe Leu Leu Ser Arg Pro Glu Pro Met Trp Ala Glu Leu Leu  
 305 310 315 320  
 GGC CTC GGC GGC GGC AAC CAG GGC GGC GGC CAT GGC GGC CAA CAG GGC 1008  
 Asn Lou Asn Ser Arg Asp Gln Lou Glu Arg Val Leu Phe Asp Glu Leu  
 485 490 495  
 GGC CTA GGC GGC ATC GGC AAG ACC CAG AAG ACC GGC AAG GGC TCG ACC 1336  
 Gly Leu Pro Pro Ile Gly Lys Thr Glu Lys Thr Gly Lys Arg Ser Thr  
 500 505 510  
 ACC GGC GGC CTC CTC CAG CTC TTA ACC CAG GGC CAG GGC ATC CTC GGC 1384  
 Ser Ala Ala Val Leu Glu Leu Leu Arg Glu Ala His Pro Ile Val Gly  
 515 520 525  
 GGC ATC CTC CAG TAC GGC CAG CTC ATC AAG CTC AAG ACC ACC TAC ATA 1432  
 Arg Ile Leu Glu Tyr Arg Glu Leu Met Lys Leu Lys Ser Thr Tyr Ile  
 530 535 540  
 CAG GGC CTC GGC ACC CTC CTC CAG GGC AAA ACC GGC GGC CTC CAG ACC 1480  
 Asp Pro Lou Pro Arg Lou Val His Pro Lys Thr Gly Arg Leu His Thr  
 545 550 555  
 GGC TTC AAG CAG ACC GGC ACC GGC ACC GGC GGC CTC TCG ACC TCG CAG 1528  
 Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser Ser Asp  
 560 565 570  
 GGC AAG CTC CAG AAC ATC GGC CTC GGC ACC GGC TTA GGC CAG GGC ATC 1576  
 Pro Asn Lou Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu Gly Gln Arg Ile  
 580 585 590  
 GGC AAG GGC TTC ATT GGC CAG CAG GGC CAT CTC CTC GGC CTC GAG 1624  
 Arg Lys Ala Phe Ile Ala Glu Gly His Leu Leu Val Ala Leu Asp  
 595 600 605  
 TAT ACC CAG ATC CAG CTC GGC CTC CTC GGC CAG CTC TCG GGC CAG CAG 1672  
 Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser Gly Asp Glu  
 610 615 620  
 AAG CTC ATC GGC CTC TTC GGC GAA GGC AAG CAG ATC CAG ACC CAG ACC 1720  
 Asn Leu Ile Arg Val Phe Arg Glu Gly Lys Asp Ile His Thr Glu Thr  
 625 630 635 640  
 GGC GGC TCG ATC TTC GGC CTC GGC GGC CAG GGC GGC GGC GGC ATC 1768

Ala Ala Trp Met Phe Gly Val Pro Pro Glu Gly Val Asp Gly Ala Met  
645 650 655

CGC CGC CGC CGC AAC AGC GTG AAC TTC CGC GTG CTC TAC CGC ATC TCC 2016

Arg Arg Ala Ala Lys Thr Val Asn Phe Gly Val Leu Tyr Gly Met Ser  
660 665 670

CGC CAC CGC CTC TCC CAG CAG CTC TCC ATC CGC TAC CAG CAG CGC CGC 2064

Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu Ser Ile Pro Tyr Glu Glu Ala Ala  
675 680 685

CGC TTC ATC CAG CGC TAC TTC CAG AGC TTC CGC AAG GTG CGC CGC TCG 2112

Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys Val Arg Ala Trp  
690 695 700

ATC CGC AAA ACC TTC CAG CAG CGC CGC AAG AAG CGC TAC GTG GAG ACC 2160

Ile Ala Lys Thr Leu Glu Glu Gly Arg Lys Lys Gly Tyr Val Glu Thr  
705 710 715 720

CTC TTC CGC CGC CGC CGC TAC CTC CGC CAG CTC AAG CGC CGC CTC AAG 2200

Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Asn Ala Arg Val Lys  
725 730 735

AGC CTC CGC CAG CGC CGC GAG CGC ATC CGC TTC AAG ATC CGC CTC CAG 2256

Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn Met Pro Val Gln  
740 745 750

CGC ACC CGC CGC CAG CTC ATC AAG CTC CGC ATC GTG AAG CTC TTC CGC 2304

Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val Lys Leu Phe Pro  
755 760 765

AGC CTC AAG CGC TTC CGC GTT CGC ATC CTC CTC CAG GTG CAG CAG CAG 2352

Arg Leu Arg Pro Leu Gly Val Arg Ile Leu Leu Gln Val His Asp Glu  
770 775 780

CTC CTC TTC GAG CGC CCA AAG CGC CGC CGC CAG CAG CGC CGC CAG TTC 2400

Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Ala Arg Ala Glu Glu Ala Ala Gln Leu  
785 790 795 800

CGC AAG CAG ACC ATC GAA CGC GTT TAC CGC CTC TCC CTC CGC CTC CAG 2448

Ala Lys Glu Thr Met Glu Gly Val Tyr Pro Leu Ser Val Pro Leu Glu  
805 810 815

Thr Pro Gly Trp Leu Gln Glu Arg Tyr Gly Leu Ser Pro Glu Arg Trp  
165 170 175

Val Glu Tyr Arg Ala Leu Val Gly Asp Pro Ser Asp Asn Leu Pro Gly  
180 185 190

Val Pro Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Leu Lys Leu Leu Lys Glu Trp  
195 200 205

Gly Ser Leu Glu Ala Ile Leu Lys Asn Leu Asp Gln Val Lys Pro Glu  
210 215 220

Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Asn Asn Leu Asp Lys Leu Gln Met Ser  
225 230 235

Leu Glu Leu Ser Arg Leu Arg Thr Asp Leu Pro Leu Glu Val Asp Phe  
240 245 250

Ala Lys Arg Arg Glu Pro Asp Tyr Glu Gly Leu Lys Ala Phe Leu Glu  
255 260 265 270

Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly Leu Leu Glu Ala  
275 280 285

Pro Lys Glu Ala Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Gly Gly Ala Phe  
290 295 300

Leu Gly Phe Leu Leu Ser Arg Pro Glu Pro Met Trp Ala Glu Leu Leu  
305 310 315 320

Ala Leu Ala Gly Ala Lys Glu Gly Arg Val His Arg Ala Glu Asp Pro  
325 330 335

Val Gly Ala Leu Lys Asp Leu Lys Glu Ile Arg Gly Leu Leu Ala Lys  
340 345 350

Asp Leu Ser Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Arg Glu Ile Pro Pro Gly  
355 360 365

Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro Gly Asn Thr Asn  
370 375 380

Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp Lys Glu Asp Ala  
385 390 395 400

Ala Ala Arg Ala Leu Leu Ser Glu Arg Leu Trp Glu Ala Leu Tyr Pro  
405 410 415

Arg Val Ala Glu Glu Glu Arg Leu Leu Trp Leu Tyr Arg Glu Val Glu  
420 425 430

CTC CAG GTG CGC ATC CGC CAG CAG TCG GTT TCG CGC AAG CGC 2496

Val Glu Val Gly Met Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala Lys Ala  
020 025 030

TAC

2493

(2) 配列番号: 6:

(i) 配列の構成:

(A) 長さ: 830 アミノ酸

(B) 図: アミノ酸

(D) トポロジー: 直線状

(ii) 分子の級: 蛋白質

(xi) 配列の位置: 配列番号: 6:

Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu Val Asp Gly  
1 5 10 15

His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe Phe Ala Leu Lys Gly Leu Thr Thr  
20 25 30

Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala Lys Ser Leu  
35 40 45

Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Glu Val Ala Ile Val Val Phe Asp  
50 55 60

Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Gly Ala Tyr Lys Ala  
65 70 75 80

Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln Leu Ala Leu Ile  
85 90 95

Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Leu Val Arg Leu Glu Val Pro Gly  
100 105 110

Phe Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Thr Leu Ala Lys Lys Ala Glu Arg  
115 120 125

Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Ser Ala Asp Arg Asp Leu Tyr Gln  
130 135 140

Leu Leu Ser Asp Arg Ile His Leu Leu His Pro Glu Gly Glu Val Leu  
145 150 155 160

Arg Pro Leu Ala Gln Val Leu Ala His Met Glu Ala Thr Gly Val Arg  
435 440 445

Leu Asp Val Pro Tyr Leu Glu Ala Leu Ser Gln Glu Val Ala Phe Glu  
450 455 460

Leu Glu Arg Leu Glu Ala Glu Val His Arg Leu Ala Gly His Pro Phe  
465 470 475 480

Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu Phe Asp Glu Leu  
485 490 495

Gly Leu Pro Pro Ile Gly Lys Thr Glu Lys Thr Gly Lys Arg Ser Thr  
500 505 510

Ser Ala Ala Val Leu Glu Leu Leu Arg Glu Ala His Pro Ile Val Gly  
515 520 525

Arg Ile Leu Glu Tyr Arg Glu Leu Met Lys Leu Lys Ser Thr Tyr Ile  
530 535 540

Asp Pro Leu Pro Arg Leu Val His Pro Lys Thr Gly Arg Leu His Thr  
545 550 555 560

Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser Asp  
565 570 575

Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu Gly Gln Arg Ile  
580 585 590

Arg Lys Ala Phe Ile Ala Glu Glu Gly His Leu Leu Val Ala Leu Asp  
595 600 605

Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser Gly Asp Glu  
610 615 620

Asn Leu Ile Arg Val Phe Arg Glu Gly Lys Asp Ile His Thr Glu Thr  
625 630 635 640

Ala Ala Trp Met Phe Gly Val Pro Pro Glu Gly Val Asp Gly Ala Met  
645 650 655

Arg Arg Ala Ala Lys Thr Val Asn Phe Gly Val Leu Tyr Gly Met Ser  
660 665 670

Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu Ser Ile Pro Tyr Glu Glu Ala Ala  
675 680 685

Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys Val Arg Ala Trp  
690 695 700

Ile Ala Lys Thr Leu Glu Gly Arg Lys Lys Gly Tyr Val Glu Thr  
703 710 713 720  
Leu Phe Gly Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Asn Ala Arg Val Lys  
723 730 733  
Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn Met Pro Val Glu  
740 743 750  
Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val Lys Leu Phe Pro  
753 760 763  
Arg Leu Arg Pro Leu Gly Val Arg Ile Leu Leu Glu Val His Asp Glu  
770 773 780  
Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Ala Arg Ala Glu Glu Ala Ala Glu Leu  
783 790 793 800  
Ala Lys Glu Thr Met Glu Gly Val Tyr Phe Leu Ser Val Pro Leu Glu  
803 810 813  
Val Glu Val Gly Met Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala Lys Ala  
820 823 830

(2) 配列番号: 1:

(1) 配列の特徴:

(A) 長さ: 2505塩基対

(B) 型: 紡織

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 環状

(E) 分子の型: DNA (genomic)

(F) ハイボセティカル: NO

(G) アンチセンス: NO

(H) 由来:

(A) 生物: *Thomomys talpae* Z05

(I) 特徴:

(A) NAME/REF: CDS

(B) 位置: 1..2502

CCC CAC CTC ATC ACC CGC GAC TGG CTT TCG CAG AAG TAC CGC GTT AAG 528  
Gly His Leu Ile Thr Pro Glu Trp Leu Trp Glu Lys Tyr Gly Leu Lys 535  
CGC GAG CAG TGG GTG GAC TTC CCC CGC CTC CTC CGG CAG CCC TCG CAC 576  
Pro Glu Glu Trp Val Asp Phe Arg Ala Leu Val Gly Asp Pro Ser Asp 583  
AAC CTC CGC CGC GTC AAC CGC ATC CGC CAG AAC ACC CGC CTC AAG CTC 624  
Asn Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Leu Lys Leu 631  
CTC AAG CAG TCG CGA AGC CTC GAA AAT ATC CTC AAG AAC CTC GAC CGC 672  
Leu Lys Glu Trp Gly Ser Leu Glu Asn Ile Leu Lys Asn Leu Asp Arg 679  
CTC AAG CGC GAA AGC GTC CGC GAA AGC ATC AAG CGC CAC CTC GAA CAC 720  
Val Lys Pro Glu Ser Val Arg Glu Arg Ile Lys Ala His Leu Glu Asp 727  
CTT AAG CTC TCG TTG CAG CTT TCG CGC CTC CGC TCG CAC CTC CCC CTC 768  
Leu Lys Leu Ser Leu Glu Leu Ser Arg Val Arg Ser Asp Leu Pro Leu 775  
GAG GTG CAG TTC CGC CGC AGC CGC CAG CCT GAC CGC GAA CGC CTT CGC 816  
Glu Val Asp Phe Ala Arg Arg Glu Pro Asp Arg Glu Gly Leu Arg 823  
CGC TTT TTC CAG CGC TTG CAG TTC CGC AGC CTC CTC CAC GAG TTC CGC 864  
Ala Phe Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly 871  
CTC CTC CAG CGC CGC CGC CGC CTC CAG CAG CGC CGC TCG CGC CGC CGC 912  
Leu Leu Glu Ala Pro Ala Pro Leu Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro 919  
GAA CGC CGC TTC GTC CGC TTC CTC CTC TCG CGC CGC CAG CGC ATC TCG 960  
Glu Gly Ala Phe Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Pro Glu Pro Met Trp 967  
CGC GAG CTT AAA CGC CTC CGC CGC TCG AAG GAG CGC CGC CTC CAC CGC 1008

(21) 配列の位置: 配列番号: 1:

ATG AAG CGC ATG CTT CGC CTC TTT GAA CCC AAA CGC CGC GTT CTC CTC 40  
Met Lys Ala Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu 47  
CTC CAC CGC CAG CAG CTG CGC TAC CGC ACC TTC TTC CGC CTA AAG CGC 96  
Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe Phe Ala Leu Lys Gly 103  
CTC ACC ACG AGC CGC CGC GAA CGC CTC CAG CGC GTT TAC CGC TTC CGC 144  
Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Glu Ala Val Tyr Gly Phe Ala 151  
AAG ACC CTC CTC AAG CGC CTC AAG CAG CAG CGC TAC AAG CGC CTC TTC 192  
Lys Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Tyr Lys Ala Val Phe 200  
GTG GTC TTT CAG CGC AAG CGC CCT TCC TTC CGC CAC CAG CGC TAC CAC 240  
Val Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Glu 247  
CGC TAC AAG CGA CGC CGC CGC CGC ACC CGC CAG CAC TTC CGC CGC CAG 288  
Ala Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Glu 295  
CTC CGC CTC ATC AAG CAG CTC GTC CAG CTC CTC CGC TTT ACT CGC CTC 336  
Leu Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Phe Thr Arg Leu 343  
GAG CTT CGC CGC TTT CAG CGC CAG CAG CTC CTC CGC ACC CTG CGC AAG 384  
Glu Val Pro Gly Phe Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Thr Leu Ala Lys 391  
AAG CGC GAA AGC GAG CGC TAC CAG CTC CGC ATC CTC ACC CGC CAG CGC 432  
Lys Ala Glu Arg Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Arg 439  
GAG CTT TAC CAG CTC CTC TCC CAG CGC CTC CGC GTC CTC CAG CGC CAG 480  
Asp Leu Tyr Glu Leu Val Ser Asp Arg Val Ala Val Leu His Pro Glu 487  
Ala Glu Leu Lys Ala Leu Ala Ala Cys Lys Glu Gly Arg Val His Arg 528  
CCA AAG CAG CGC TTG CGC CGC CTA AAG CAG CTC AAG CAG CTC CGA CGC 1056  
Ala Lys Asp Pro Leu Ala Gly Leu Lys Asp Leu Lys Glu Val Arg Gly 1063  
CTC CTC CGC AAG CAG CTC CGC CTT TTG CGC CTT CGC CAG CGC CTC CAC 1104  
Leu Leu Ala Lys Asp Leu Ala Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Leu Asp 1111  
CTC CGC CCT TCG CAG CAG CGC ATG CTC CTC CGC TAC CTC GTC CAC CGC 1152  
Leu Ala Pro Ser Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro 1159  
TCC AAC ACC ACC CGC CAG CGC CTC CGC CGC CGC TAC CGC CGC CAG TCC 1200  
Ser Asn Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp 1207  
ACC GAG CAG CGC CGC CAG CGC CGC CTC CTC CGC CAG CGC CTC CAG CAA 1240  
Thr Glu Asp Ala Ala His Arg Ala Leu Leu Ala Glu Arg Leu Glu Glu 1247  
AAC CTC TTG GAA CGC CTC AAG CGA CAG GAA AAG CTC CTT TCG CTC TAC 1296  
Asn Leu Leu Glu Arg Leu Lys Gly Glu Glu Lys Leu Leu Trp Leu Tyr 1303  
CAA CAG CTC GAA AAG CGC CTC TCC CGC CTC CTC CGC CAG ATC CAG CGC 1344  
Gln Glu Val Glu Lys Pro Leu Ser Arg Val Leu Ala His Met Glu Ala 1351  
ACC CGC CTA AGC CTC CAG CTC CGC TAT CTA AAG CGC CTT TCC CTC CAG 1392  
Thr Gly Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Lys Ala Leu Ser Leu Glu 1399  
CTT CGC CAG CAG ATT CGC CGC CTC CAG CAG CAG GTC TTC CGC CTC CGC 1440  
Leu Ala Glu Glu Ile Arg Arg Leu Glu Glu Glu Val Phe Arg Leu Ala 1447  
CGC CAG CGC TTC AAG CTC AAG TCG CCT CAG CAG CTA CAG CGC CTC CTC 1488

Gly His Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu  
403 490 493

TTT GAC CAG CTT ACC CTT CCC GCG CTG GCG AAG ACC CAA AAG ACC GCG 1536

Phe Asn Glu Leu Arg Leu Pro Ala Leu Gly Lys Thr Gln Lys Thr Gly  
500 505 510

AAC CCG TCC ACC ACC GCG CCG GTG CTG GAG GCG CTG ACC GAG CCG CAC 1504

Lys Arg Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His  
515 520 525

CCC ATC GTG CAC AAG ATC CTC CAC CAC CCG CAG CTC ACC AAG CTC AAG 1632

Phe Ile Val Glu Lys Ile Leu Gln His Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys  
530 535 540

AAC ACC TAG CTG CAC CCG CTC CCG GCG CTC CTC CAC CCG ACC ACC GCG 1660

Asn Thr Tyr Val Asp Pro Leu Pro Gly Leu Val His Pro Arg Thr Gly  
545 550 555 560

CCC CTC CAC ACC CCG TTC AAC CAG ACA GCG ACC CCG ACC CCA ACC CTC 1728

Arg Leu His Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu  
565 570 575

TCT ACC TCC CAC CCC AAC CTG CAG AAC ATC CCC ATC CCG ACC CCG TTG 1776

Ser Ser Ser Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Ile Arg Thr Pro Leu  
580 585 590

GCG CAG ACC ATC CCG CCG CCG TTC CTC CCG CAG CCG CCA TCC CCG TTC 1824

Gly Gln Arg Ile Arg Arg Ala Phe Val Ala Glu Ala Gly Trp Ala Leu  
595 600 605

GTG CCG CTG CAC TAT ACC CAG ATA CAG CTC CCG CTC CTC CCG CAC CTC 1872

Val Ala Leu Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu  
610 615 620

TCC CCG CAC CAG AAC CTC ATC ACC CTC TTC CAG CAG CCG AAG CAC ATC 1920

Ser Gly Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Lys Asp Ile  
625 630 635 640

CAC ACC CAG ACC CCA ACC TCC ATC TTC CCG CTC TCC CCG CAG CCG CTC 1968

His Thr Gln Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Ser Pro Glu Ala Val  
645 650 655

GAC CCC CTG ATG CCG CCG CCG GCG AAG ACC GTG AAC TTC CCG CTC CTC 2016

Asp Pro Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Val Asn Phe Gly Val Leu  
660 665 670

TAC CCG ATG TCC CCG CAT ACC CTC TCC CAG CAG CTT CCG ATC CCG TAC 2064

Tyr Gly Met Ser Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr  
675 680 685

CAC CAC CCG CTG CCG TTT ATA CAG CCG TAC TTC CAA ACC TTC CCG AAG 2112

Glu Glu Ala Val Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys  
690 695 700

GTG CCG CCG TCC ATA CAA AAG ACC CTC GAG CAG CCG ACC AAG CCG CCG 2160

Val Arg Ala Trp Ile Glu Lys Thr Leu Glu Glu Gly Arg Lys Arg Gly  
705 710 715 720

TAC GTG CAA ACC CTC TTC CCA ACA ACC CCG TAC GTG CCG CAG CTC AAC 2208

Tyr Val Glu Thr Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Asn  
725 730 735

CCC CCG GTG AAG ACC CTC ACC CAG CCG CCG CAG CCG ATC CCG TTC AAC 2256

Ala Arg Val Lys Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn  
740 745 750

ATC CCG CTC CAG CCG ACC CCG CCG CAC CTC ATG AAG CTC CCG ATG CTC 2304

Met Pro Val Gln Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val  
755 760 765

AAG CTC TTC CCG CAC CTC CCG CAG ATG CCG CCG CCG ATG CTC CTC CAG 2352

Lys Leu Phe Pro His Leu Arg Glu Met Gly Ala Arg Met Leu Leu Gln  
770 775 780

CTC CAC CAG CAG CTC CTC CTC GAG CCG CCG CAA CCG CCG CCG CAG CAG 2400

Val His Asp Glu Leu Leu Leu Glu Ala Pro Gln Ala Arg Ala Glu Glu  
785 790 795 800

CTG CCG CCG TTC CCG AAG CAG CCG ATC CAG AAG CCG TAT CCG CTC CCG 2448

Val Ala Ala Leu Ala Lys Glu Ala Met Glu Lys Ala Tyr Pro Leu Ala  
805 810 815

CTC CCG CTC CAG CTC CAG CTC CCG ATC CCG CAG CAC TCC CTT TCC CCG 2496

Val Pro Leu Glu Val Glu Val Gly Ile Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala  
820 825 830

AAC CCG TGA 2505

Lys Gly

(2) 配列番号: 8:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 834 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の型: 蛋白質

(xi) 配列の記載: 配列番号: 8:

Met Lys Ala Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu  
1 5 10 15

Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe Phe Ala Leu Lys Gly  
20 25 30

Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala  
35 40 45

Lys Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Tyr Lys Ala Val Phe  
50 55 60

Val Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Glu  
65 70 75 80

Ala Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln  
85 90 95

Leu Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Phe Thr Arg Leu  
100 105 110

Glu Val Pro Gly Phe Glu Ala Asp Val Leu Ala Thr Leu Ala Lys  
115 120 125

Lys Ala Glu Arg Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Arg  
130 135 140

Asp Leu Tyr Gln Leu Val Ser Asp Arg Val Ala Val Leu His Pro Glu  
145 150 155 160

Gly His Leu Ile Thr Pro Glu Trp Leu Trp Glu Lys Tyr Gly Leu Lys  
165 170 175

Pro Glu Gln Trp Val Asp Phe Arg Ala Leu Val Gly Asp Pro Ser Asp  
180 185 190

Asn Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Leu Lys Leu  
195 200 205

Leu Lys Glu Trp Gly Ser Leu Glu Asn Ile Leu Lys Asn Leu Asp Arg  
210 215 220

Val Lys Pro Glu Ser Val Arg Glu Arg Ile Lys Ala His Leu Glu Asp  
225 230 235 240

Leu Lys Leu Ser Leu Glu Leu Ser Arg Val Arg Ser Asp Leu Pro Leu  
245 250 255

Glu Val Asp Phe Ala Arg Arg Arg Glu Pro Asp Arg Glu Gly Leu Arg  
260 265 270

Ala Phe Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly  
275 280 285

Leu Leu Glu Ala Pro Ala Pro Leu Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro  
290 295 300

Glu Gly Ala Phe Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Pro Glu Pro Met Trp  
305 310 315 320

Ala Glu Leu Lys Ala Leu Ala Ala Cys Lys Glu Gly Arg Val His Arg  
325 330 335

Ala Lys Asp Pro Leu Ala Gly Leu Lys Asp Leu Lys Glu Val Arg Gly  
340 345 350

Leu Leu Ala Lys Asp Leu Ala Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Leu Asp  
355 360 365

Leu Ala Pro Ser Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro  
370 375 380

Ser Asn Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp  
385 390 395 400

Thr Glu Asp Ala Ala His Arg Ala Leu Leu Ala Glu Arg Leu Gln Gln  
405 410 415

Asn Leu Leu Glu Arg Leu Lys Gly Glu Glu Lys Leu Leu Trp Leu Tyr  
420 425 430

特表平5-506364 (38)

Gln Glu Val Glu Lys Pro Leu Ser Arg Val Leu Ala His Met Glu Ala  
435 440 443  
Thr Gly Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Lys Ala Leu Ser Leu Glu  
430 435 440  
Leu Ala Glu Glu Ile Arg Arg Leu Glu Glu Val Phe Arg Leu Ala  
463 470 475 480  
Gly His Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu  
483 490 495  
Phe Asp Glu Leu Arg Leu Pro Ala Leu Gly Lys Thr Gln Lys Thr Gly  
300 305 310  
Lys Arg Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His  
315 320 325  
Pro Ile Val Glu Lys Ile Leu Gln His Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys  
330 335 340  
Asn Thr Tyr Val Asp Pro Leu Pro Gly Leu Val His Pro Arg Thr Gly  
345 350 355 360  
Arg Leu His Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Thr Gly Arg Leu  
365 370 375  
Ser Ser Ser Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Ile Arg Thr Pro Leu  
380 385 390  
Gly Gln Arg Ile Arg Arg Ala Phe Val Ala Glu Ala Gly Trp Ala Leu  
395 400 405  
Val Ala Leu Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu  
410 415 420  
Ser Gly Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Lys Asp Ile  
425 430 435 440  
His Thr Gln Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Ser Pro Glu Ala Val  
445 450 455  
Asp Pro Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Val Asn Phe Gly Val Leu  
460 465 470  
Tyr Gly Met Ser Ala His Arg Leu Ser Glu Glu Leu Ala Ile Pro Tyr  
475 480 485 490  
Glu Glu Ala Val Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys  
495 500 505

Val Arg Ala Trp Ile Glu Lys Thr Leu Glu Glu Gly Arg Lys Arg Gly  
705 710 715  
Tyr Val Glu Thr Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Asn  
725 730 735  
Ala Arg Val Lys Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn  
740 745 750  
Met Pro Val Gln Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val  
755 760 765  
Lys Leu Phe Pro His Leu Arg Glu Met Gly Ala Arg Met Leu Leu Glu  
770 775 780  
Val His Asp Glu Leu Leu Leu Glu Ala Pro Gln Ala Arg Ala Glu Glu  
785 790 795 800  
Val Ala Ala Leu Ala Lys Glu Ala Met Glu Lys Ala Tyr Pro Leu Ala  
805 810 815  
Val Pro Leu Glu Val Glu Val Gly Ile Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala  
820 825 830

Lys Gly

(2) 配列番号: 9:

(1) 配列の特徴:

(A) 長さ: 2505 塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 塩の組成: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(E) 分子の型: DNA (genomic)

(F) ハイボセティカル: 80

(G) アンチセンス: 80

(H) 由来:

(A) 生物: *Thermus thermophilus*

(I) 特徴:

(A) NAME/KEY: CDS

(B) 位置: 1..2502

(ii) 配列の記載: 配列番号: 9:

ATG GAG CCG ATG CTT CCG CTC TTT GAA CCC AAA CCC CCG CTC CTC CTC 48  
Met Glu Ala Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu 15  
CTG GAG CCG CAC CAC CTC CCC TAC CCC ACC TTC TTC CCC CTG AAG CCC 96  
Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe Phe Ala Leu Lys Gly 20  
CTC ACC ACC ACC CCC CCC GAA CCC CTC CAG CCC CTC TAC CCC TTC CCC 144  
Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala 35  
AAG ACC CTC CTC AAG CCC CTC AAG CAG CAC CCC TAC AAG CCC CTC TTC 192  
Lys Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Tyr Lys Ala Val Phe 50  
CTC CTC TTT CAC CCC AAG CCC CCC TCC TTC CCC CAG CAG CCC TAC GAG 240  
Val Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Glu 65  
GCC TAC AAG CCG CCC ACC CCC CCC ACC CCC GAG GAG TTC CCC CCG CAG 288  
Ala Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln 95  
CTC CCC CTC ATG AAG CAG CTC CTC CAG CTC CTC GCG TTT ACC CCC CTC 336  
Leu Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Phe Thr Arg Leu 100  
CAG CTC CCC CCG TAC CAG CCG CAG CAG GTT CTC CCC ACC CTC CCG AAG 384  
Glu Val Pro Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Thr Leu Ala Lys 115  
AAG CCG GAA AAG CAG CCG TAC CAG CTC CCC ATC CTC ACC CCC CAG CCC 432  
Lys Ala Glu Lys Gln Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Arg 130  
CAG CTC TAC CAA CTC CTC TCC CAG CCC CTC CCC CTC CTC CAG CCC CAG 480

Asp Leu Tyr Gln Leu Val Ser Asp Arg Val Ala Val Leu His Pro Glu 145  
CGC CAC CTC ATC ACC CCG CAG TCG CTT TCG CAG AAC TAC CCC CTC ACC 328  
Gly His Leu Ile Thr Pro Glu Trp Leu Trp Glu Lys Tyr Gly Leu Arg 165  
CCC CAG CAG TCG CTC CAG TTC CCC CCC CTC CTC CCG CAG CCC TCC CAG 376  
Pro Glu Gln Trp Val Asp Phe Arg Ala Leu Val Gly Asp Pro Ser Asp 180  
AAC CTC CCC CCG CTC AAG CCC ATC CCG CAG AAG ACC CCC CTC AAG CTC 424  
Asn Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Leu Lys Leu 195  
CTC AAG CAG TCG CCA ACC CTC GAA AAC CTC CTC AAG AAC CTC CAG CCC 472  
Leu Lys Glu Trp Gly Ser Leu Glu Asn Leu Leu Lys Asn Leu Asp Arg 210  
CTA AAG CCA CAA AAC CTC CCG CAG AAG ATC AAG CCC CAG CTC GAA CAG 520  
Val Lys Pro Glu Asn Val Arg Glu Lys Ile Lys Ala His Leu Glu Asp 225  
CTC ACC CTC TCC TTC CAG CTC TCC CCG CTC CCG ACC CAG CTC CCC CTC 568  
Leu Arg Leu Ser Leu Glu Leu Ser Arg Val Arg Thr Asp Leu Pro Leu 245  
CAG CTC CAG CTC CCC CAG CCG CCG CAG CCC CAG CCG CAG CTC ACC 616  
Glu Val Asp Leu Ala Gln Gly Arg Glu Pro Asp Arg Glu Gly Leu Arg 260  
CCC TTC CTC GAG ACC CTC CAG TTC CCC ACC CTC CTC CAG CAG TTC CCC 664  
Ala Phe Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly 275  
CTC CTC CAG CCC CCC CCC CCC CTC CAG CAG CCG CCC TCG CCC CCG CCC 712  
Leu Leu Glu Ala Pro Ala Pro Leu Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Ser 290  
GAA CCG CCG TTC CTC CCG TTC CTC TCC CCC CCC CAG CCG ATG TCG 760

Glu Gly Ala Phe Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Pro Glu Pro Met Trp 303  
 310 313 320  
 GCG GAG CTT AAA GCG CTC GCG GCG TCG AGC GAG GCG GCG CTC GAG GCG 1000  
 Ala Glu Leu Lys Ala Leu Ala Ala Cys Arg Asp Gly Arg Val His Arg 325  
 330 333  
 GCA GCA GAG GCG TTC GCG GCG CTA AAG GAG CTC AAG GAG CTC GCG GCG 1036  
 Ala Ala Asp Pro Leu Ala Gly Leu Lys Asp Leu Lys Glu Val Arg Gly 340  
 343 350  
 CTC CTC GCG AAG GAG CTC GCG GCG TCG GCG TCG AAG GAG GCG CTA GAG 1124  
 Leu Leu Ala Lys Asp Leu Ala Val Leu Ala Ser Arg Glu Gly Leu Asp 355  
 360 363  
 CTC CTC GCG GCG GAG GAG GCG ATG CTC CTC GCG TAC CTC CTC GAG GCG 1132  
 Leu Val Pro Gly Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro 370  
 375 380  
 TCG AAG ACC ACC GCG GAG GCG GCG GCG GCG TAC GCG GCG GAG TCG 1200  
 Ser Asn Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp 390  
 393 400  
 ACG GAG GAG GCG GCG GCG GCG CTC CTC TCG GAG ACG CTC CAT GCG 1248  
 Thr Glu Asp Ala Ala His Arg Ala Leu Leu Ser Glu Arg Leu His Arg 405  
 410 413  
 AAC CTC CTT AAG GCG CTC GAG GCG GAG GAG AAG CTC CTT TCG CTC TAC 1296  
 Asn Leu Leu Lys Arg Leu Glu Gly Glu Glu Lys Leu Leu Trp Leu Tyr 420  
 423 430  
 CAG GAG GTC GAA AAG GCG CTC TCG GCG GCG CTC GCG GAG ATG GAG GCG 1344  
 His Glu Val Glu Lys Pro Leu Ser Arg Val Leu Ala His Met Glu Ala 435  
 440 443  
 ACC GCG GTA GCG CTC GAG GCG GCG TAC CTT GAG GCG CTT TCG CTC GAG 1392  
 Thr Gly Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Glu Ala Leu Ser Leu Glu 450  
 453 460  
 CTT GCG GAG GAG ATC GCG GCG CTC GAG GAG GAG GTC TTC GCG TTC GCG 1440  
 Leu Ala Glu Glu Ile Arg Arg Leu Glu Glu Glu Val Phe Arg Leu Ala 465  
 470 475 480

His Thr Cln Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Pro Phe Glu Ala Val 645  
 650 655  
 GAG GCG CTC ATC GCG GCG GCG AAG ACC GTC AAC TTC GCG CTC GTC 2016  
 Asp Pro Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Val Asn Phe Gly Val Leu 660  
 665 670  
 TAC GCG ATG TCG GCG CAT ACG CTC TCG GAG GAG CTT GCG ATC GCG TAC 2064  
 Tyr Gly Met Ser Ala His Arg Leu Ser Cln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr 675  
 680 685  
 CAG GAG GCG GTC GCG TTT ATA GAG GCG TAC TTC GAA ACG TTC GCG AAG 2112  
 Glu Glu Ala Val Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Cln Ser Phe Pro Lys 690  
 693 700  
 CTC GCG GCG TCG ATA GAA AAG ACC CTC GAG GAG GCG ACG AAG GCG GCG 2160  
 Val Arg Ala Trp Ile Glu Lys Thr Leu Glu Glu Gly Arg Lys Arg Gly 705  
 710 715 720  
 TAC CTC GAA ACC CTC TTC GCA ACA ACG GCG TAC GTC GCG GAG CTC AAC 2208  
 Tyr Val Glu Thr Leu Phe Gly Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Asn 725  
 730 735  
 GCG GCG CTC AAG ACC GTC ACG GAG GCG GCG GAG GCG ATG GCG TTC AAG 2256  
 Ala Arg Val Lys Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn 740  
 745 750  
 ATG GCG GTC GAG GCG ACC GCG GCG GAG CTC ATG AAG CTC GCG ATG GTC 2304  
 Met Pro Val Glu Cln Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val 755  
 760 765  
 AAG CTC TTC GCG GCG CTC GCG GAG ATG GCG GCG GCG ATG CTC CTC GAG 2352  
 Lys Leu Phe Pro Arg Leu Arg Glu Met Gly Ala Arg Met Leu Leu Cln 770  
 775 780  
 GTC GAG GAG GAG CTC CTC CTG GAG GCG GCG GAA GCG GCG GCG GAG GAG 2400  
 Val His Asp Glu Leu Leu Leu Glu Ala Pro Cln Ala Arg Ala Glu Glu 785  
 790 795 800  
 GTC GCG GCT TTC GCG AAG GAG GCG ATG GAG AAG GCG TAT GCG CTC GCG 2448

GCG GAG GCG TTC AAC CTC AAC TCG GCG GAG GAG CTC GAA ACG GTC CTC 1480  
 Gly His Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Cln Leu Glu Arg Val Leu 805  
 810 815  
 TTT GAG GAG CTT ACG CTT GCG GCG TTC GCG AAG ACG GAA AAG ACA GCG 1536  
 Phe Asp Glu Leu Arg Leu Pro Ala Leu Gly Lys Thr Cln Lys Thr Gly 820  
 825 830  
 AAC GCG TCG ACC ACC GCG GCG GCG GTC CTC GAG GCG CTA GCG GAG GCG GAG 1584  
 Lys Arg Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His 835  
 840 845  
 GCG ATC GTC GAG AAC ATC CTC GAG GAG GCG GAG CTC ACC AAG CTC AAG 1632  
 Pro Ile Val Glu Lys Ile Leu Cln His Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys 850  
 855 860  
 AAC ACC TAC GTC GAG GCG CTC GCA ACC CTC CTC GAG GCG ACG ACC GCG 1680  
 Asn Thr Tyr Val Asp Pro Leu Pro Ser Leu Val His Pro Arg Thr Gly 865  
 870 875  
 GCG CTC GAG ACC GCG TTC AAC GAG ACC GCG ACC GCG ACC GCG GCG CTT 1728  
 Arg Leu His Thr Arg Phe Asn Cln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu 880  
 885 890  
 AGT ACC TCG GAG GCG AAC CTC GAG AAC ATC GCG GTC GCG ACC GCG TTC 1776  
 Ser Ser Ser Asp Pro Asn Leu Cln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu 895  
 900 905  
 GCG GAG ACC ATC GCG GCG GCG TTC CTC GCG GAG GCG GCG TCG GCG TTC 1824  
 Gly Cln Arg Ile Arg Arg Ala Phe Val Ala Glu Ala Cln Trp Ala Leu 910  
 915 920  
 GTC GCG CTC GAG TAT ACC GAG ATA GAG CTC GCG GTC CTC GCG GAG CTC 1872  
 Val Ala Leu Asp Tyr Ser Cln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu 925  
 930 935  
 TCG GCG GAG GAA AAC CTC ATC ACC CTC TTC GAG GAG GCG AAG GAG ATC 1920  
 Ser Gly Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Cln Glu Gly Lys Asp Ile 940  
 945 950  
 CAG ACC GAG ACC GCA ACC TCG ATC TTC GCG CTC GCG GCG GAG GCG GTC 1968

Val Ala Ala Leu Ala Lys Glu Ala Met Glu Lys Ala Tyr Pro Leu Ala 955  
 960 965  
 GTC GCG CTC GAG CTC GAG CTC GCG ATC GCG GAG GAG TCG CTT TCG GCG 2496  
 Val Pro Leu Cln Val Glu Val Gly Met Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala 970  
 975 980  
 AAC GCT TAC 2505  
 Lys Gly

(2) 配列番号: 10:

(1) 配列の特徴:

(A) 長さ: 834 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直線状

(B) 分子の型: 蛋白質

(21) 配列の配列: 配列番号: 10:

Met Glu Ala Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu 1  
 5 10 15  
 Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe Phe Ala Leu Lys Gly 20  
 25 30  
 Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Cln Ala Val Tyr Gly Phe Ala 35  
 40 45  
 Lys Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Tyr Lys Ala Val Phe 50  
 55 60  
 Val Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Glu 65  
 70 75 80  
 Ala Tyr Lys Ala Cln Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Cln 85  
 90 95  
 Leu Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Phe Thr Arg Leu 100  
 105 110  
 Glu Val Pro Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Thr Leu Ala Lys 115  
 120 125

Lys Ala Glu Lys Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Arg  
130 135 140  
Asp Leu Tyr Glu Leu Val Ser Asp Arg Val Ala Val Leu His Pro Glu  
145 150 155 160  
Gly His Leu Ile Thr Pro Glu Trp Leu Trp Glu Lys Tyr Gly Leu Arg  
165 170 175  
Pro Glu Cln Trp Val Asp Phe Arg Ala Leu Val Gly Asp Pro Ser Asp  
180 185 190  
Asn Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Leu Lys Leu  
195 200 205  
Leu Lys Glu Trp Gly Ser Leu Glu Asn Leu Lys Asn Leu Asp Arg  
210 215 220  
Val Lys Pro Glu Asn Val Arg Glu Lys Ile Lys Ala His Leu Glu Asp  
225 230 235 240  
Leu Arg Leu Ser Leu Glu Leu Ser Arg Val Arg Thr Asp Leu Pro Leu  
245 250 255  
Glu Val Asp Leu Ala Cln Gly Arg Glu Pro Asp Arg Glu Gly Leu Arg  
260 265 270  
Ala Phe Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly  
275 280 285  
Leu Leu Glu Ala Pro Ala Pro Leu Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro  
290 295 300  
Glu Gly Ala Phe Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Pro Glu Pro Met Trp  
305 310 315 320  
Ala Glu Leu Lys Ala Leu Ala Ala Cys Arg Asp Gly Arg Val His Arg  
325 330 335  
Ala Ala Asp Pro Leu Ala Gly Leu Lys Asp Leu Lys Glu Val Arg Gly  
340 345 350  
Leu Leu Ala Lys Asp Leu Ala Val Leu Ala Ser Arg Glu Gly Leu Asp  
355 360 365  
Leu Val Pro Gly Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro  
370 375 380  
Ser Asn Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp  
385 390 395 400  
Thr Glu Asp Ala Ala His Arg Ala Leu Leu Ser Glu Arg Leu His Arg  
405 410 415

Asn Leu Leu Lys Arg Leu Glu Gly Glu Lys Leu Leu Trp Leu Tyr  
420 425 430  
His Glu Val Glu Lys Pro Leu Ser Arg Val Leu Ala His Met Glu Ala  
435 440 445  
Thr Gly Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Cln Ala Leu Ser Leu Glu  
450 455 460  
Leu Ala Glu Glu Ile Arg Arg Leu Glu Glu Glu Val Phe Arg Leu Ala  
465 470 475 480  
Gly His Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Cln Leu Glu Arg Val Leu  
485 490 495  
Phe Asp Glu Leu Arg Leu Pro Ala Leu Gly Lys Thr Cln Lys Thr Gly  
500 505 510  
Lys Arg Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His  
515 520 525  
Pro Ile Val Glu Lys Ile Leu Cln His Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys  
530 535 540  
Asn Thr Tyr Val Asp Pro Leu Pro Ser Leu Val His Pro Arg Thr Gly  
545 550 555 560  
Arg Leu His Thr Arg Phe Asn Cln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu  
565 570 575  
Ser Ser Ser Asp Pro Asn Leu Cln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu  
580 585 590  
Gly Cln Arg Ile Arg Arg Ala Phe Val Ala Glu Ala Gly Trp Ala Leu  
595 600 605  
Val Ala Leu Asp Tyr Ser Cln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu  
610 615 620  
Ser Gly Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Cln Glu Gly Lys Asp Ile  
625 630 635 640  
His Thr Cln Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Pro Pro Glu Ala Val  
645 650 655  
Asp Pro Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Val Asn Phe Gly Val Leu  
660 665 670  
Tyr Gly Met Ser Ala His Arg Leu Ser Cln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr  
675 680 685  
Glu Glu Ala Val Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Cln Ser Phe Pro Lys  
690 695 700

Val Arg Ala Trp Ile Glu Lys Thr Leu Glu Glu Gly Arg Lys Arg Gly  
705 710 715 720  
Tyr Val Glu Thr Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Asn  
725 730 735  
Ala Arg Val Lys Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn  
740 745 750  
Met Pro Val Cln Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val  
755 760 765  
Lys Leu Phe Pro Arg Leu Arg Glu Met Gly Ala Arg Met Leu Leu Cln  
770 775 780  
Val His Asp Glu Leu Leu Leu Glu Ala Pro Cln Ala Arg Ala Glu Glu  
785 790 795 800  
Val Ala Ala Leu Ala Lys Glu Ala Met Glu Lys Ala Tyr Pro Leu Ala  
805 810 815  
Val Pro Leu Glu Val Glu Val Gly Met Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala  
820 825 830  
Lys Gly

(2) 配列番号: 11:

(1) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 2679 塩基対
- (B) 図: 核膜
- (C) 図の像: 一本目
- (D) トポロジー: 正確状

(II) 分子の型: DNA (genomic)

- (i) ハイボセチカル: 80
- (iv) アンチセンス: 80

(vi) 由来:

(A) 生物: *Thromosiphia africana*

(vii) 特徴:

(A) DANE/DBY: CBS

(B) 位置: 1..2676

(xi) 配列の記号: 配列番号: 11:

ATC GCA AAG ATC TTT CTA TTT CAT GCA ACT GCA TTA CTA TAC ACA GCA 48  
Met Gly Lys Met Phe Leu Phe Asp Gly Thr Gly Leu Val Tyr Arg Ala 13  
TTT TAT GCT ATA CAT CAA TCT GTT CAA ACT TCG TCT GGT TTA CAC ACT 96  
Phe Tyr Ala Ile Asp Cln Ser Leu Cln Thr Ser Ser Gly Leu His Thr 20 25 30  
AAT GGT CTA TAC GCA CTT ACT AAA ATC CTT ATA AAA TTT TTA AAA GAA 144  
Asn Ala Val Tyr Gly Leu Thr Lys Met Leu Ile Lys Phe Leu Lys Glu 35 40 45  
CAT ATC ACT ATT GCA AAA CAT GCT TCT GTT TTT GTT TTA CAT TCA AAA 192  
His Ile Ser Ile Gly Lys Asp Ala Cys Val Phe Val Leu Asp Ser Lys 50 55 60  
GCT GCT ACC AAA AAA ACA AAG CAT ATT CTT CAA ACA TAT AAA GCA AAT 240  
Gly Gly Ser Lys Lys Arg Lys Asp Ile Leu Glu Thr Tyr Lys Ala Asn 65 70 75 80  
AGC GCA TCA ACC GCT CAT TTA CTT TTA CAC GAA ATT CCA TAT CTA GAA 200  
Arg Pro Ser Thr Pro Asp Leu Leu Leu Glu Cln Ile Pro Tyr Val Glu 85 90 95  
GAA CTT CTT CAT GCT GTT CCA ATA AAA CTT TTA AAA ATA GAA GGC TTT 336  
Glu Leu Val Asp Ala Leu Gly Ile Lys Val Leu Lys Ile Glu Gly Phe 100 105 110  
GAA GCT CAT CAC ATT ATT GCT ACC CTT TCT AAA AAA TTT GAA AGT CAT 384  
Glu Ala Asp Asp Ile Ile Ala Thr Leu Ser Lys Lys Phe Glu Ser Asp 115 120 125  
TTT CAA AAG CTA AAG ATA ATA ACT GCA CAT AAA CAT CTT TTA CAA CTT 432  
Phe Glu Val Asn Ile Ile Thr Gly Asp Lys Asp Leu Leu Cln Leu 130 135 140  
GTT TCT CAT AAG GTT TTT GTT TCG ACA CTA GAA ACA GCA ATA ACA CAT 480

Val Ser Asp Lys Val Phe Val Trp Arg Val Glu Arg Gly Ile Thr Asp  
143 150 155 160

TTC GTA TTC TAC CAT ACA AAT AAA CTC ATT GAA AAA TAT GGA ATC TAC 320

Lou Val Lou Tyr Asp Arg Asn Lys Val Ile Glu Lys Tyr Gly Ile Tyr 163 170 173

CCA GAA CAA TTC AAA CAT TAT ITA TCT CTT CTC GGT GAT CAG ATT GAT 376

Pco Glu Glu Phe Lys Asp Tyr Lou Ser Lou Val Gly Asp Glu Ile Asp 180 185 190

AAT ATC CCA GCA CTT AAA CCA ATA CCA AAC AAA ACA CCT GTT TCG CTT 624

Asn Ile Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Lys Lys Thr Ala Val Ser Lou 193 200 205

TTC AAA AAA TAT AAT AGC TTC GAA AAT GTA TTA AAA AAT ATT AAC CTT 672

Lou Lys Lys Tyr Asn Ser Lou Glu Asn Val Lou Lys Asn Ile Asn Lou 210 215 220

TTC AGC CAA AAA TTA ACA AGC CTT TTC GAA CAT TCA AAG CAA GAT TTC 720

Lou Thr Glu Lys Lou Arg Arg Lou Lou Glu Asp Ser Lys Glu Asp Lou 223 230 235

CAA AAA ACT ATA GAA CTT CTC GAC TTC ATA TAT CAT GTA CCA ATC GAT 768

Gln Lys Ser Ile Glu Lou Val Glu Lou Ile Tyr Asp Val Pro Met Asp 245 250 255

GTG CAA AAA CAT CAA ATA ATT TAT ACA CCG TAT AAT CCA GAT AAG CTT 816

Val Glu Lys Asp Glu Ile Ile Tyr Arg Gly Tyr Asn Pco Asp Lys Lou 260 265 270

TTA AAC GTA TTA AAA AAG TAC GAA TTT TCA TCT ATA ATT AAG GAG TTA 864

Lou Lys Val Lou Lys Lys Tyr Glu Phe Ser Ser Ile Ile Lys Glu Lou 275 280 285

AAT TTA CAA CAA AAA TTA CAA AAG CAA TAT ATA CTC GTA GAT AAT GAA 912

Asn Lou Glu Glu Lys Lou Glu Lys Glu Tyr Ile Lou Val Asp Asn Glu 290 295 300

GAT AAA TTG AAA AAA CTT CCA CAA CAG ATA CAA AAA TAC AAA ACT TTT 960

Ser Cys Glu Asp Ala Asp Val Thr Tyr Arg Ile Phe Arg Lys Lou Gly  
365 470 475 480

AGC AAG ATA TAT CAA AAT CAG ATC GAA AAG TTC TTT TAC GAA ATT GAG 1488

Arg Lys Ile Tyr Glu Asn Glu Met Glu Lys Lou Phe Tyr Glu Ile Glu 485 490 495

ATG CCG TTA ATT GAT CTT CTT TCA GAA ATC CAA CTA AAT CCA CTC TAT 1536

Met Pro Lou Ile Asp Val Lou Ser Glu Met Glu Lou Asn Gly Val Tyr 500 505 510

TTT GAT CAG GAA TAT TTA AAA CAA TTA TCA AAA AAA TAT CAA CAA AAA 1584

Phe Asp Glu Glu Tyr Lou Lys Glu Lou Ser Lys Lys Tyr Gln Glu Lys 515 520 525

ATC GAT CCA ATT AAC CAA AAA GTT TTT CAG ATA CCT GGT GAA ACT TTC 1632

Met Asp Gly Ile Lys Glu Lys Val Phe Glu Ile Ala Gly Glu Thr Phe 530 535 540

AAT TTA AAC TCT TCA ACT CAA GTA CCA TAT ATA CTA TTT GAA AAA TTA 1680

Asn Lou Asn Ser Ser Thr Gln Val Ala Tyr Ile Lou Phe Glu Lys Lou 545 550 555

AAT ATT CCT CCT TAC AAA AAA ACA CCG ACT GGT AAG TTT TCA ACT AAT 1728

Asn Ile Ala Pro Tyr Lys Lys Thr Ala Thr Gly Lys Phe Ser Thr Asn 565 570 575

CGC GAA GTT TTA CAA GAA CTT TCA AAA CAA CAT CAA ATT CCA AAA TTC 1776

Ala Glu Val Lou Glu Glu Lou Ser Lys Glu Met Glu Ile Ala Lys Lou 580 585 590

TTG CTG CAG TAT CCA AAG TAT CAA AAA TTA AAA ACT ACA TAT ATT GAT 1824

Lou Lou Glu Tyr Arg Lys Tyr Glu Lys Lou Lys Ser Thr Tyr Ile Asp 595 600 605

TCA ATA CCG TTA TCT ATT AAT CCA AAA ACA AAC AGC GTC CAT ACT ACT 1872

Ser Ile Pro Lou Ser Ile Asn Arg Lys Thr Asn Arg Val Ile Thr Thr 610 615 620

TTT CAT CAA ACA CCA ACT TCT ACT CCA ACA TTA ACT ACT TCA AAT CCA 1920

Asp Lys Lou Lys Lys Lou Ala Glu Glu Ile Glu Lys Tyr Lys Thr Phe  
305 310 315 320

TCA ATT GAT ACG GAA CAA ACT TCA CTT GAT CCA TTT GAA GCT AAA CTC 1000

Ser Ile Asp Thr Glu Thr Thr Ser Lou Asp Pro Phe Glu Ala Lys Lou 325 330 335

GTI CCG ATC TCT ATT TCG ACA ATC CAA CCG AAG CCG TAT TAT ATT CCG 1036

Val Gly Ile Ser Ile Ser Thr Met Glu Gly Lys Ala Tyr Tyr Ile Pro 340 345 350

CTG TCT CAT TTT CCA GGT AAC AAT ATT TCC AAA ACT TTA ATA GAT AAA 1104

Val Ser Met Phe Gly Ala Lys Asn Ile Ser Lys Ser Lou Ile Asp Lys 355 360 365

TTT CTA AAA CAA ATT TTC CAA CAG AAG GAT TAT AAT ATC GTT GGT CAG 1152

Phe Lou Lys Gln Ile Lou Gln Glu Lys Asp Tyr Asn Ile Val Gly Gln 370 375 380

AAT TTA AAA TTT CAC TAT CAG AIT TTT AAA ACC ATC GGT TTT TCT CCA 1200

Asn Lou Lys Phe Asp Tyr Glu Ile Phe Lys Ser Met Gly Phe Ser Pro 385 390 395

AAT CTT CCG CAT TTT GAT ACG ATC AAT CCA CCG TAT CTT TTA AAT CCA 1240

Asn Val Pro Ile Phe Asp Thr Met Ile Ala Ala Tyr Lou Lou Asn Pro 405 410 415

GAT CAA AAA CGT TTT AAT CTT CAA CAG CTA TCC TTA AAA TAT TTA CGT 1296

Asp Glu Lys Arg Phe Asn Lou Glu Glu Lou Ser Lou Lys Tyr Lou Gly 420 425 430

TAT AAA ATG ATC TCG TTT CAT GAA TTA GTA AAT GAA AAT GTA CCA TTC 1344

Tyr Lys Met Ile Ser Phe Asp Glu Lou Val Asn Glu Asn Val Pro Lou 435 440 445

TTT CCA AAT CAC TTT TCG TAT CTT CCA CTA GAA ACA CCG GTT CAG TAT 1392

Phe Gly Asn Asp Phe Ser Tyr Val Pro Lou Glu Arg Ala Val Glu Tyr 450 455 460

TCC TGT CAA CAT CCG CAT CTC ACA TAC ACA ATA TTT ACA AAG CTT GGT 1440

Phe His Glu Thr Gly Thr Ser Thr Gly Arg Lou Ser Ser Ser Asn Pro  
625 630 635 640

AAT TTC CAA AAT CTT CCA ACA ACA ACC CAA CAA CCA AAA GAA ATA AGA 1968

Asn Lou Gln Asn Lou Pro Thr Arg Ser Glu Glu Gly Lys Glu Ile Arg 645 650 655

AAA CCA CTA ACA CCT CAA ACA CAA CAT TCG TCG ATT TTA CCT CCT CAG 2016

Lys Ala Val Arg Pro Gln Arg Gln Asp Trp Trp Ile Lou Gly Ala Asp 660 665 670

TAT TCT CAG ATA GAA CTA ACC CTT TTA CCG CAT CTA ACT AAA CAT CAA 2064

Tyr Ser Gln Ile Glu Lou Arg Val Lou Ala His Val Ser Lys Asp Glu 675 680 685

AAT CTA CTT AAA CCA TTT AAA CAA CAT TTA CAT ATT CAT ACA ATT ACT 2112

Asn Lou Lou Lys Ala Phe Lys Glu Asp Lou Asp Ile His Thr Ile Thr 690 695 700

CGT CCG AAA ATT TTT GGT CTT TCA CAG ATC TTT CTT ACT CAA CAA ATC 2160

Ala Ala Lys Ile Phe Gly Val Ser Glu Met Phe Val Ser Glu Gln Met 705 710 715

AGA ACA CTT CCA AAG ATC GTA AAT TTT CCA ATT ATT TAT CCA GTE TCA 2208

Arg Arg Val Gly Lys Met Val Asn Phe Ala Ile Ile Tyr Gly Val Ser 720 725 730

CGT TAT CGT CTT TCA AAG ACA ATT CGT CTT ACT GTT TCA CAG ACT AAA 2256

Pro Tyr Gly Lou Ser Lys Arg Ile Gly Lou Ser Val Ser Glu Thr Lys 735 740 745

AAA ATA ATA CAT AAG TAT TTT ACA TAC TAT AAA CCA CTT TTT CAA TAT 2304

Lys Ile Ile Asp Asn Tyr Phe Arg Tyr Tyr Lys Gly Val Phe Glu Tyr 750 755 760

TTA AAA ACC ATC AAA GAT CAA CCA ACC AAA AAA CGT TAT CTT ACA ACC 2352

Lou Lys Arg Met Lys Asp Glu Ala Arg Lys Lys Gly Tyr Val Thr Thr 765 770 775

CTT TTT CCA ACC CCG ACA TAT ATT CCA CAG TTA ACA TCG AAA AAT CGT 2400

Lou Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Ile Pro Gln Lou Arg Ser Lys Asn Gly 780 785 790

AAT ACA CTT CAA GAA GGA GAA ATA GCT GTA AAC ACT GCA ATT CAA 2440  
 Aon Arg Val Cln Glu Gly Glu Arg Ilo Ala Val Asn Thr Pro Ilo Cln  
 003 010 013  
 GGA ACA GCA GCT GAT ATA ATA AAG ATA GCT ATG ATT AAT ATT CAT AAT 2496  
 Gly Thr Ala Ala Asp Ilo Ilo Lys Ilo Ala Met Ilo Aon Ilo Ilo Aon  
 020 023 030  
 ACA TTG AAG AAG CAA AAT GTA CCG TCA AAA ATG ATA TTG CAG GTT CAT 2544  
 Arg Lys Lys Lys Glu Aon Lys Arg Ser Lys Met Ilo Lys Cln Val His  
 033 040 043  
 GAC GAG TTA GTT TTT GAA GTC CCG GAT AAT GAA GTG CAG ATT GTA AAA 2592  
 Asp Glu Lys Val Phe Glu Val Pro Asp Aon Glu Lys Glu Ilo Val Lys  
 050 053 060  
 GAT TTA GTA ACA CAT CAG ATG CAA AAT GCA GTT AAG CTA CAC GTT CCT 2640  
 Asp Lys Val Arg Asp Glu Met Glu Aon Ala Val Lys Lys Asp Val Pro  
 063 070 073 080  
 TTA AAA GTA CAT GTT TAT TAT GCA AAA CAG TCG CAA TAA 2679  
 Lys Lys Val Asp Val Tyr Tyr Gly Lys Glu Trp Glu  
 083 090

(2) 配列番号: 12:

(1) 配列の略称:

(A) 長さ: 892 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直線状

(II) 分子の型: 蛋白質

(III) 配列の記号: 配列番号: 12:

Met Gly Lys Met Phe Lys Phe Asp Gly Thr Gly Lys Val Tyr Arg Ala  
 1 5 10 15  
 Phe Tyr Ala Ilo Asp Cln Ser Lys Cln Thr Ser Ser Gly Lys His Thr  
 20 25 30  
 Aon Ala Val Tyr Gly Lys Thr Lys Met Lys Ilo Lys Phe Lys Lys Glu  
 35 40 45

Ser Ilo Asp Thr Glu Thr Thr Ser Lys Asp Pro Phe Glu Ala Lys Lys  
 325 330 335  
 Val Gly Ilo Ser Ilo Ser Thr Met Glu Gly Lys Ala Tyr Tyr Ilo Pro  
 340 345 350  
 Val Ser His Phe Gly Ala Lys Aon Ilo Ser Lys Ser Lys Ilo Asp Lys  
 355 360 365  
 Phe Lys Lys Cln Ilo Lys Glu Glu Lys Asp Tyr Aon Ilo Val Gly Cln  
 370 375 380  
 Aon Lys Lys Phe Asp Tyr Glu Ilo Phe Lys Ser Met Gly Phe Ser Pro  
 385 390 395 400  
 Aon Val Pro His Phe Asp Thr Met Ilo Ala Ala Tyr Lys Lys Aon Pro  
 405 410 415  
 Asp Glu Lys Arg Phe Aon Lys Glu Glu Lys Ser Lys Tyr Lys Gly  
 420 425 430  
 Tyr Lys Met Ilo Ser Phe Asp Glu Lys Val Aon Glu Aon Val Pro Lys  
 435 440 445  
 Phe Gly Aon Asp Phe Ser Tyr Val Pro Lys Glu Arg Ala Val Gly Tyr  
 450 455 460  
 Ser Cys Glu Asp Ala Asp Val Thr Tyr Arg Ilo Phe Arg Lys Lys Gly  
 465 470 475 480  
 Arg Lys Ilo Tyr Glu Aon Glu Met Glu Lys Lys Phe Tyr Glu Ilo Glu  
 485 490 495  
 Met Pro Lys Ilo Asp Val Lys Ser Glu Met Glu Lys Aon Gly Val Tyr  
 500 505 510  
 Phe Asp Glu Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Ser Lys Tyr Cln Glu Lys  
 515 520 525  
 Met Asp Gly Ilo Lys Glu Lys Val Phe Glu Ilo Ala Gly Glu Thr Phe  
 530 535 540  
 Aon Lys Aon Ser Ser Thr Glu Val Ala Tyr Ilo Lys Phe Glu Lys Lys  
 545 550 555 560  
 Aon Ilo Ala Pro Tyr Lys Lys Thr Ala Thr Gly Lys Phe Ser Thr Aon  
 565 570 575  
 Ala Glu Val Lys Glu Glu Lys Ser Lys Glu His Glu Ilo Ala Lys Lys  
 580 585 590

His Ilo Ser Ilo Gly Lys Asp Ala Cys Val Phe Val Lys Asp Ser Lys  
 59 60  
 Gly Gly Ser Lys Lys Arg Lys Asp Ilo Lys Glu Thr Tyr Lys Ala Aon  
 65 70 75 80  
 Arg Pro Ser Thr Pro Asp Lys Lys Lys Glu Cln Ilo Pro Tyr Val Glu  
 85 90 95  
 Glu Lys Val Asp Ala Lys Gly Ilo Lys Val Lys Lys Ilo Glu Gly Phe  
 100 105 110  
 Glu Ala Asp Asp Ilo Ilo Ala Thr Lys Ser Lys Lys Phe Glu Ser Asp  
 115 120 125  
 Phe Glu Lys Val Aon Ilo Ilo Thr Gly Asp Lys Asp Lys Lys Cln Lys  
 130 135 140  
 Val Ser Asp Lys Val Phe Val Trp Arg Val Glu Arg Gly Ilo Thr Asp  
 145 150 155 160  
 Lys Val Lys Tyr Asp Arg Aon Lys Val Ilo Glu Lys Tyr Gly Ilo Tyr  
 165 170 175  
 Pro Glu Cln Phe Lys Asp Tyr Lys Ser Lys Val Gly Asp Cln Ilo Asp  
 180 185 190  
 Aon Ilo Pro Gly Val Lys Gly Ilo Gly Lys Lys Thr Ala Val Ser Lys  
 195 200 205  
 Lys Lys Tyr Aon Ser Lys Glu Aon Val Lys Lys Aon Ilo Aon Lys  
 210 215 220  
 Lys Thr Glu Lys Lys Arg Arg Lys Lys Glu Ser Lys Glu Asp Lys  
 225 230 235 240  
 Glu Lys Ser Ilo Glu Lys Val Glu Lys Ilo Tyr Asp Val Pro Met Asp  
 245 250 255  
 Val Glu Lys Asp Glu Ilo Ilo Tyr Arg Gly Tyr Aon Pro Asp Lys Lys  
 260 265 270  
 Lys Lys Val Lys Lys Tyr Glu Phe Ser Ser Ilo Ilo Lys Glu Lys  
 275 280 285  
 Aon Lys Glu Glu Lys Lys Glu Lys Glu Tyr Ilo Lys Val Asp Aon Glu  
 290 295 300  
 Asp Lys Lys Lys Lys Lys Ala Glu Glu Ilo Glu Lys Tyr Lys Thr Phe  
 305 310 315 320

Lys Lys Glu Tyr Arg Lys Tyr Cln Lys Lys Lys Ser Thr Tyr Ilo Asp  
 325 330 335 340  
 Ser Ilo Pro Lys Ser Ilo Aon Arg Lys Thr Aon Arg Val His Thr Thr  
 345 350 355 360  
 Phe His Cln Thr Gly Thr Ser Thr Gly Arg Lys Ser Ser Ser Aon Pro  
 365 370 375 380  
 Aon Lys Cln Aon Lys Pro Thr Arg Ser Glu Glu Gly Lys Glu Ilo Arg  
 385 390 395  
 Lys Ala Val Arg Pro Cln Arg Cln Asp Trp Trp Ilo Lys Glu Ala Asp  
 400 405 410 415  
 Tyr Ser Cln Ilo Glu Lys Arg Val Lys Ala His Val Ser Lys Asp Glu  
 420 425 430 435  
 Aon Lys Lys Lys Ala Phe Lys Glu Asp Lys Asp Ilo His Thr Ilo Thr  
 440 445 450 455  
 Ala Ala Lys Ilo Phe Gly Val Ser Glu Met Phe Val Ser Glu Cln Met  
 460 465 470 475  
 Arg Arg Val Gly Lys Met Val Aon Phe Ala Ilo Ilo Tyr Gly Val Ser  
 480 485 490 495  
 Pro Tyr Gly Lys Ser Lys Arg Ilo Gly Lys Ser Val Ser Glu Thr Lys  
 500 505 510 515  
 Lys Ilo Ilo Asp Aon Tyr Phe Arg Tyr Tyr Lys Gly Val Phe Glu Tyr  
 520 525 530 535  
 Lys Lys Arg Met Lys Asp Glu Ala Arg Lys Lys Gly Tyr Val Thr Thr  
 540 545 550 555  
 Lys Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Ilo Pro Cln Lys Arg Ser Lys Aon Gly  
 560 565 570 575  
 Aon Arg Val Cln Glu Gly Cln Arg Ilo Ala Val Aon Thr Pro Ilo Cln  
 580 585 590  
 Gly Thr Ala Ala Asp Ilo Ilo Lys Ilo Ala Met Ilo Aon Ilo His Aon  
 595 600 605 610  
 Arg Lys Lys Lys Glu Aon Lys Arg Ser Lys Met Ilo Lys Cln Val His  
 615 620 625 630  
 Asp Glu Lys Val Phe Glu Val Pro Asp Aon Glu Lys Glu Ilo Val Lys  
 635 640 645 650

Asp Leu Val Arg Asp Glu Met Glu Asn Ala Val Lys Leu Asp Val Pro  
061 070 075 080  
Leu Lys Val Asp Val Tyr Tyr Gly Lys Glu Trp Glu  
003 090

(2) 配列番号: 13:

(1) 配列の特徴:

(A) 長さ: 33ヌクレオチド

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(E) 分子の型: DNA プローブ SH33

(F) ハイボセティカル: 00

(iv) アンチセンス: 00

(xi) 配列の記号: 配列番号: 13:

GATCGCTGCG CGTACCACCC ACACCGGCGG CGG

33

(2) 配列番号: 14:

(1) 配列の特徴:

(A) 長さ: 30ヌクレオチド

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(E) 分子の型: DNA プローブ SH37

(F) ハイボセティカル: 00

(iv) アンチセンス: 00

(xi) 配列の記号: 配列番号: 14:

CGCGTAGGGG GCTGGCAACT GTACCGGTCA

30

(2) 配列番号: 15:

(2) 配列番号: 17:

(1) 配列の特徴:

(A) 長さ: 5アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(E) 分子の型: ペプチド

(F) ハイボセティカル: 00

(iv) アンチセンス: 00

(v) フラグメント型: internal

(xi) 配列の記号: 配列番号: 17:

His Glu Ala Tyr Glu

(2) 配列番号: 18:

(1) 配列の特徴:

(A) 長さ: 4アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(E) 分子の型: ペプチド

(F) ハイボセティカル: 00

(iv) アンチセンス: 00

(v) フラグメント型: internal

(ix) 特徴:

(A) NAME/KEY: ペプチド

(B) 位置: 1..4

(D) 他の情報: /ラベル=Xaa

/注="Xaa-Leu又はIle"

(xi) 配列の記号: 配列番号: 18:

(1) 配列の特徴:

(A) 長さ: 4アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(E) 分子の型: ペプチド

(F) ハイボセティカル: YES

(iv) アンチセンス: 00

(ix) 特徴:

(A) NAME/KEY: ペプチド

(B) 位置: 1..4

(D) 他の情報: /ラベル=Xaa

/注="Xaa-Val又はIhr"

(xi) 配列の記号: 配列番号: 15:

Ala Xaa Tyr Gly

1

(2) 配列番号: 16:

(1) 配列の特徴:

(A) 長さ: 5アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(E) 分子の型: ペプチド

(F) ハイボセティカル: 00

(iv) アンチセンス: 00

(v) フラグメント型: internal

(xi) 配列の記号: 配列番号: 16:

His Glu Ala Tyr Gly

1

Xaa Leu Glu Thr

1

(2) 配列番号: 19:

(1) 配列の特徴:

(A) 長さ: 7アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(E) 分子の型: ペプチド

(F) ハイボセティカル: 00

(iv) アンチセンス: 00

(v) フラグメント型: internal

(ix) 特徴:

(A) NAME/KEY: ペプチド

(B) 位置: 1..7

(D) 他の情報: /ラベル=Xaa

/注="Xaa-Leu又はIle"

(xi) 配列の記号: 配列番号: 19:

Xaa Leu Glu Thr Tyr Lys Ala

1

(2) 配列番号: 20:

(1) 配列の特徴:

(A) 長さ: 7アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(E) 分子の型: ペプチド

(F) ハイボセティカル: 00

(iv) アンチセンス: 00

(v) フラグメント型: internal  
(w) 特徴:  
(A) HAHE/HEV: ペプチド  
(B) 位置: 1..7  
(D) 他の特徴: /ラベル=Xaa1-d  
/注= "Xaa1=Ile 又はLeu 又はAla: Xaa2-d,  
それぞれ任意のアミノ酸

(x1) 配列の記号: 配列番号: 20:

Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Lys Ala  
1 5

(2) 配列番号: 21:

(1) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 22 スクレオチド
- (B) タイプ: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の型: DNA プライマー M61

(iii) ハイボセティカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(x1) 配列の記号: 配列番号: 21:

AGGACTACAA CTGCCACACA CC

(2) 配列番号: 22:

(1) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 38 スクレオチド
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(2) 配列番号: 25:

(1) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 25 スクレオチド
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の型: DNA プライマー FL10

(iii) ハイボセティカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(x1) 配列の記号: 配列番号: 25:

GGCGTACCTT TGTCTCAGG CCAAC

(2) 配列番号: 26:

(1) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 28 スクレオチド
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の型: DNA プライマー FL63

(iii) ハイボセティカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(x1) 配列の記号: 配列番号: 26:

GATAAAGGCA TGGTTCAGCT TGTGAGG

(2) 配列番号: 27:

(1) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 27 スクレオチド
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖

(ii) 分子の型: DNA プライマー R401

(iii) ハイボセティカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(x1) 配列の記号: 配列番号: 22:

C6AGGCGGGC CAGCCCCAGG AGATCTACCA GCTCCTTG

(2) 配列番号: 23:

(1) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 20 核酸
- (B) タイプ: 核酸
- (C) 鎖の数: 二本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の型: DNA プライマー D629

(iii) ハイボセティカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(x1) 配列の記号: 配列番号: 23:

AGCTTATGTC TCCAAAAGCT

(2) 配列番号: 24:

(1) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 16 スクレオチド
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の型: DNA プライマー D630

(iii) ハイボセティカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(x1) 配列の記号: 配列番号: 24:

AGCTTTTGGC CACATA

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の型: DNA プライマー FL69

(iii) ハイボセティカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(x1) 配列の記号: 配列番号: 27:

TGTACTTCTC TGAAGCTCA ACACGAG

(2) 配列番号: 28:

(1) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 36 スクレオチド
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の型: DNA プライマー FL64

(iii) ハイボセティカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(x1) 配列の記号: 配列番号: 28:

CTGAGGCATG TCTTGTGAC CGGTACTAT CAATAT

(2) 配列番号: 29:

(1) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 18 スクレオチド
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の型: DNA プライマー FL65

(iii) ハイボセティカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(x1) 配列の記号: 配列番号: 29:

TACTAACCGG TGACAAAG

(2) 配列番号: 30:

(1) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 31 スクレオチド
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(II) 分子の型: DNA プライマー FL66

(iii) ハイボセチカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(xi) 配列の記号: 配列番号: 30:

CTATGCCATG CATAGATGG TTCTACTTC C

(2) 配列番号: 31:

(1) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 31 スクレオチド
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(II) 分子の型: DNA プライマー FL67

(iii) ハイボセチカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(xi) 配列の記号: 配列番号: 31:

CAAGCCCATG CAGACTTACA AGGCTCAAG A

(2) 配列番号: 32:

(1) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 49 スクレオチド
- (B) 型: 核酸

(xi) 配列の記号: 配列番号: 34:

GTCCGCATAT GGCCTCTAAG GAAGCTGAGG AGGCCCCCTG CCCCCCGCC 49

(2) 配列番号: 35:

(1) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 37 スクレオチド
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(II) 分子の型: DNA プライマー 1SR01

(iii) ハイボセチカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(xi) 配列の記号: 配列番号: 35:

GACGCGATC TCAGGCCCTG CCGGAAAGCC AGTCCTC

(2) 配列番号: 36:

(1) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 41 スクレオチド
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(II) 分子の型: DNA プライマー DG122

(iii) ハイボセチカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(xi) 配列の記号: 配列番号: 36:

CCTCTGAGG GCAGATCTGA TATCAACCT TCGCGGAAG C

(2) 配列番号: 37:

(1) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 48 スクレオチド

18

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(II) 分子の型: DNA プライマー 7ZA292

(iii) ハイボセチカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(xi) 配列の記号: 配列番号: 32:

GTCCGCATAT GGCCTCTGCT CCTCTTGAGG AGGCCCCCTG CCCCCCGCC 49

(2) 配列番号: 33:

(1) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 37 スクレオチド
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(II) 分子の型: DNA プライマー 1ZR01

(iii) ハイボセチカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(xi) 配列の記号: 配列番号: 33:

GACGCGATC TCAGCCCTTG CCGGAAAGCC AGTCCTC

(2) 配列番号: 34:

(1) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 49 スクレオチド
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(II) 分子の型: DNA プライマー TSA288

(iii) ハイボセチカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

31

37

37

41

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(II) 分子の型: DNA プライマー TAF1285

(iii) ハイボセチカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(xi) 配列の記号: 配列番号: 37:

GTCCGCATAT GATTAAAGAA CTTAATTAC AGGAAGGATT AGGAAGG 48

(2) 配列番号: 38:

(1) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 46 スクレオチド
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(II) 分子の型: DNA プライマー TAFR01

(iii) ハイボセチカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(xi) 配列の記号: 配列番号: 38:

CCTTACGCC AGGATCCTCA TTCGACTCT TTTCATAT AAACAT

46

## 要 約 書

本発明は、それぞれの天然ポリメラーゼに比べて異なるレベル 5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性を示す熱安定性DNA ポリメラーゼに関する。熱安定性DNA ポリメラーゼ中の特定の保存されたアミノ酸ドメインが変異又は欠失されてポリメラーゼ 5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性を変更する。本発明は同様にこのような変更されたポリメラーゼを単離及び製造するための手段にも関する。

## 国際調査報告

|   |   |                        |
|---|---|------------------------|
| International Application No. PCT/US 91/07035   |   |                        |
| 1. CLASSIFICATION OF SEARCH KEYWORDS (or other classification, priority, subject etc.)                  |   |                        |
| Int.Cl.5  | C 12 N 15/54 C 12 N 9/12 C 12 N 1/11  |                        |
| 2. FIELD OF INVENTION   |   |                        |
| Minimum Description Number  |   |                        |
| Classification System   | Classification System   |                        |
| Int.Cl.5  | C 12 N  |                        |
| Description Number (or other Minimum Description Number) as far as the prior art is known to the public |   |                        |
| 3. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT  |   |                        |
| Category  | Document  | Reference to Claim No. |
| P, X  | The FASEB Journal, volume 5, no. 4, March 1991, (Bethesda, MD, US) E.D. Abramson et al.: "Characterization of the 5'-3' exonuclease activity of <i>Thermus aquaticus</i> DNA polymerase", page A437, abstract no. 356, see the abstract | 1, 4                   |
| P, Y  | WO A, 9109944 (CETUS CORP.) 11 July 1991, see page 13, lines 28-34; page 14, lines 7-25; page 14, line 34 - page 15, line 15: claims 1, 2, 5 (cited in the application)   | 11-16                  |
| P, X  | WO A, 9109944 (CETUS CORP.) 11 July 1991, see page 13, lines 28-34; page 14, lines 7-25; page 14, line 34 - page 15, line 15: claims 1, 2, 5 (cited in the application)   | 1, 4                   |
| 4. CLARIFICATION  |   |                        |
| Date of first publication of the International Search Report: 29-11-1991                                |   |                        |
| Date of filing of the International Search Report: 16 JAN 1992  |   |                        |
| International Searching Authority: EUROPEAN PATENT OFFICE   |   |                        |
| Signature of International Searching Authority: M. N. KUIPER  |   |                        |

|  |  |                                 |
|--|--|---------------------------------|
| International Application No. PCT/US 91/07035                            |  |                                 |
| 3. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET) |  |                                 |
| Category   | Document   | Reference to Claim No.          |
| P, Y   | 1-21, 17-21, 12-36, 42-51, 42-66, 72-75  |                                 |
| P, Y   | WO A, 9109944 (CETUS CORP.) 11 July 1991, see claims 3, 4 (cited in the application)   | 1-7, 9, 11, 32-36, 42-66, 72-75 |
| P, X   | WO A, 9102090 (PRONEXA CORP.) 21 February 1991, see claim 1; page 6, line 34 - page 7, line 7  | 1, 4, 5, 11, 14-16, 75          |
| P, Y   | 1-8, 17-16, 42-46, 72-75   |                                 |
| Y  | The Journal of Biological Chemistry, volume 264, no. 11, 15 April 1989, Am. Soc. for Biochem. and Molecular Biology, Inc. (US) F.C. Lawler et al.: "Isolation, characterization, and expression of the <i>Escherichia coli</i> DNA polymerase gene from <i>Thermus aquaticus</i> ", pages 6427-6437, see figure 2; page 6432, lines 25-30 (cited in the application) | 1-8, 17-16, 42-46, 72-75        |
| Y  | Cell, volume 59, no. 1, 6 October 1989, Cell Press (CA, US) A. Barad et al.: "A conserved 3'-5' exonuclease active site in prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases", pages 219-228, see page 224, lines 6-10, line 21 - page 225, line 14; figure 5   | 1, 4-75                         |
| Y  | Proc. Natl. Acad. Sci., volume 86, no. 12, June 1989, Biochemistry (US) M.C. Leavitt et al.: "5' DNA polymerase: structural-functional relationships to other DNA polymerases", pages 4485-4489, see figure 4; page 4488, lines 13-15  | 1, 4-75                         |

|  |  |                        |
|--|--|------------------------|
| International Application No. PCT/US 91/07035                            |  |                        |
| 3. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET) |  |                        |
| Category   | Document   | Reference to Claim No. |
| A  | Chemical Abstracts, volume 93, no. 5, 4 August 1980 (Columbus, Ohio, US) A.S. Kaledin et al.: "Isolation and properties of DNA polymerase from extremal thermophilic bacteria <i>Thermus aquaticus</i> YI-3", see page 177, abstract 40169a, & Bishkimiya (Moscow) 1980, 45(4), 644-51 | 1, 4                   |
| A  | Chemical Abstracts, volume 85, no. 21, 22 November 1976, (Columbus, Ohio, US) A. Chien et al.: "Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile <i>Thermus aquaticus</i> ", see page 180, abstract 155556t, & J. Bacteriol. 1976, 127(3), 550-7                          | 1, 4                   |

## 国際調査報告

US 5107035  
SA 52103

This entry lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.  
The numbers are as published in the European Patent Office (EPO) file on 1/21/91.  
The European Patent Office is in no way liable for these publications which are merely given for the purpose of information.

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>number(s) | Publication<br>date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO-A- 9109944                             | 11-07-91            | WO-A- 9109950              | 11-07-91            |
| WO-A- 9109950                             | 11-07-91            | WO-A- 9109944              | 11-07-91            |
| WO-A- 9102090                             | 21-02-91            | SU-A- 6341190              | 11-03-91            |

For more details about this entry, see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/91

## 第1頁の続き

④Int. Cl. \*

C 12 N 15/54  
// C 12 Q 1/68  
(C 12 N 1/21  
C 12 R 1:10)  
(C 12 N 15/54  
C 12 R 1:01)

識別記号

庁内整理番号

ZNA

Z

8114-4B

## 優先権主張

④1990年9月28日④米国(US)④590.466

④1990年9月28日④米国(US)④590.490

## ④発明者

アブラムソン, リチャード デ  
イー.

アメリカ合衆国, カリフォルニア 94618, オークランド, #30,  
ブロード ウェイ 5901